



# Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement de la maladie d'Alzheimer

Mohamed Benchekroun

## ► To cite this version:

Mohamed Benchekroun. Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2014. Français. NNT : 2014BESA3007 . tel-01164372

**HAL Id: tel-01164372**

**<https://theses.hal.science/tel-01164372>**

Submitted on 16 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

UFR DES SCIENCES MÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES DE BESANÇON

19, rue Ambroise Paré-25030 Besançon cedex

École Doctorale Environnements-Santé

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention

Du DIPLÔME DE DOCTORAT

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

*Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique  
de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement  
de la maladie d'Alzheimer*

Présentée par

Mr Mohamed BENCHEKROUN

Soutenue publiquement le 19 Décembre 2014, devant le jury composé de :

Professeur Catherine GROSDÉMANGE-BILLIARD

Rapporteur

Docteur Karine ALVAREZ

Rapporteur

Professeur Bernard REFOUVELET

Examineur

Professeur José Luis MARCO-CONTELLAS

Examineur

Docteur Lhassane ISMAILI

Examineur



# Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie Organique et Thérapeutique, à l'UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques de Besançon, sous la direction du Professeur Bernard Refouvelet. Je le remercie vivement pour sa grande disponibilité et son écoute. Je remercie aussi chaleureusement le Docteur Lhassane Ismaili pour tous ses conseils avisés, sa grande compétence scientifique et surtout, pour son soutien moral tout au long de ces trois années de thèse. J'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur Catherine Grodemange-Billiard et au Docteur Karine Alvarez pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Leur présence à ce jury est un honneur.

Par ailleurs, je remercie tout particulièrement le Professeur José Luis Marco-Contelles d'avoir contribué activement à l'essor de ce projet et pour sa présence à ce jury. Merci également à tous nos partenaires en Espagne, en Italie et en Allemagne. Je mesure maintenant la chance inouïe que j'ai eu de pouvoir travailler avec autant d'experts et dans des domaines si variés.

Je suis aussi très reconnaissant pour l'aide que le Docteur Marc Pudlo et Monsieur Vincent Luzet ont su m'apporter au laboratoire. Cela a été très enrichissant de travailler à leurs côtés. Un grand merci à mes deux stagiaires, Olga et Allan, pour avoir participé à la synthèse de nouveaux composés. Je leur souhaite de réussir dans tout ce qu'ils entreprendront par la suite. Merci aussi à toutes les personnes que j'ai côtoyé à l'Université, de près ou de loin. Un grand choukrane aussi à tous mes amis, qui m'ont redonné du courage dans les moments difficiles : Matthieu, Xavier, Tommaso, Julien, Stéphane, Jeremy, Angélique, Alexandra. Je n'oublie pas non plus tous mes camarades du BKB Kendo avec qui j'ai tant partagé et appris, que ça soit au dojo ou à l'extérieur. Dômo arigato gozaimashita!

Marion, merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien et pour ton soutien sans faille. Enfin, je veux rendre hommage à mes parents, mes sœurs et mon frère. C'est grâce à eux que j'avance. Je leur dois tout.





# TABLE DES MATIERES



## Contenu

Remerciements.....	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	21
CHAPITRE I .....	27
La maladie d'Alzheimer : .....	27
Étiologie et approches thérapeutiques .....	27
I. Historique de la maladie d'Alzheimer .....	29
I.1 Découverte.....	29
I.2 Symptômes cliniques et diagnostic.....	31
I.2.1 Symptômes cliniques .....	31
I.2.2 Diagnostic .....	32
I.2.2.1 Tests neuropsychologiques .....	32
I.2.2.2 Biomarqueurs dans la maladie d'Alzheimer.....	32
II. Etiologie .....	35
II.1 Facteurs de risques génétiques .....	36
II.1.1 Formes familiales précoces .....	36
II.1.2 Formes tardives .....	37
II.2 Les plaques séniles ou plaques amyloïdes.....	38
II.2.1 Le peptide $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) .....	38
II.2.2 Agrégation du peptide $\beta$ -amyloïde.....	40
II.3 Les dégénérescences neurofibrillaires.....	41
II.3.1 La protéine tau.....	41
II.3.2 Hyperphosphorylation de la protéine tau et son agrégation.....	42
II.4 La neurotransmission.....	43
II.4.1 La neurotransmission cholinergique .....	43

II.4.2	Les cholinestérases .....	44
II.4.2.1	L'Acétylcholinestérase.....	45
II.4.2.2	La Butyrylcholinestérase .....	46
II.4.3	Aux origines du déficit cholinergique .....	46
II.4.4	La neurotransmission glutamatergique .....	47
II.5	Le stress oxydant.....	48
II.5.1	Le dysfonctionnement mitochondrial .....	48
II.5.2	Rôle des métaux dans le stress oxydant.....	49
II.5.3	Interactions des métaux avec le peptide $\beta$ -amyloïde .....	49
II.6	Dishoméostasie du calcium .....	50
III.	Approches thérapeutiques .....	51
III.1	Thérapies actuellement disponibles .....	53
III.1.1	Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....	53
III.1.2	Antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA .....	55
III.2	Approches mono-cible .....	55
III.2.1	Antioxydants purs .....	55
III.2.2	Antioxydants directs .....	56
III.2.3	Antioxydants ciblant la mitochondrie .....	57
III.2.4	Activateurs des défenses endogènes antioxydantes .....	58
III.2.5	Chélateurs de métaux.....	60
III.2.6	Antagonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT <sub>6</sub> .....	62
III.2.7	Inhibiteurs de la $\beta$ -sécrétase .....	63
III.2.8	Modulateurs de la $\gamma$ -sécrétase .....	65
III.2.9	Immunothérapie A $\beta$ .....	66
III.3	Approche multi-cibles .....	67
III.3.1	Inhibiteurs multicibles acétylcholinestérase/monoamine-oxydases.....	68

III.3.2	Hybrides et analogues de la tacrine .....	69
III.3.3	Hybrides du donépézil .....	72
III.3.4	Poly-amines .....	74
III.3.5	Chélateurs de métaux multi-cibles biodisponibles .....	75
IV.	Conclusion sur le chapitre I .....	76
CHAPITRE II .....		77
Chimie et biologie des réactions multicomposants .....		77
I.	Les réactions multicomposants : « couteau suisse » du chimiste médicinal.....	79
I.1	Principe des réactions multicomposants.....	79
I.2	Historique des réactions multicomposants .....	80
II.	Isonitriles et RMC.....	84
II.1	Les isonitriles.....	84
II.1.1	Synthèses .....	84
II.1.2	Structures et réactivités des isonitriles .....	90
II.1.2.1	Structures .....	90
II.1.2.2	Acidité du proton en $\alpha$ .....	91
II.1.2.3	Réactivité radicalaire .....	92
II.1.2.4	Réactivité du carbone terminal .....	92
II.2	La réaction de Passerini (P-3CR) .....	94
II.3	La réaction de Ugi (U-4CR).....	95
II.4	Modifications de la réaction de Ugi .....	97
II.4.1	Variations autour de l'acide.....	97
II.4.2	Variations autour de l'amine .....	99
II.4.3	Variantes intramoléculaires.....	101
II.5	Stratégies de post-condensation d'adduits de Passerini.....	101
II.5.1	Stratégie PADAM .....	102
II.5.2	Stratégie OPHA .....	102

II.6	Stratégies de post-condensation d'adduits de Ugi.....	103
II.6.1	Stratégie UDC.....	103
II.6.2	Couplages organométalliques intramoléculaires.....	104
II.6.3	Autres post-condensations.....	105
III.	RMC en Chimie Médicinale .....	105
III.1	Inhibiteurs de protéases.....	105
III.2	Inhibiteurs de kinases.....	106
III.3	Modulateurs de récepteurs couplés aux protéines G.....	107
III.4	L'approche multicomposants pour contrer la maladie d'Alzheimer .....	107
III.4.1	Inhibiteurs de cholinestérases.....	108
III.4.2	Inhibiteurs de la $\beta$ -sécrétase (BACE-1).....	113
IV.	Conclusion sur le chapitre II .....	113
	CHAPITRE III .....	115
	Travaux personnels.....	115
I.	Introduction.....	117
II.	$\alpha$ -acylaminocarboxamides prototypes (série A) .....	118
II.1	Synthèse.....	118
II.2	Evaluation de l'inhibition des cholinestérases.....	119
II.2.1	Le test d'Ellman .....	120
II.2.1.1	Acetylcholinestérase .....	120
II.2.1.2	Butyrylcholinestérase .....	121
II.2.2	Résultats .....	121
II.3	Evaluation de la capacité antioxydante .....	123
II.3.1	Le test DPPH .....	123
II.3.2	Résultats .....	123
II.4	Conclusions sur la série <b>A</b> .....	124

III.	Les différentes classes d'hybrides .....	126
III.1	Préparations des précurseurs .....	127
III.1.1	Synthèse des linkers tacrine .....	127
III.1.2	Synthèse des isonitriles .....	127
III.2	Etude des hybrides tacrine-acide férulique (série <b>B</b> ) .....	131
III.2.1	Introduction .....	131
III.2.2	Synthèse de la série <b>B</b> .....	132
III.2.3	Analyse RMN des composés <b>B4</b> , <b>B7</b> et <b>B13</b> .....	134
III.2.4	Evaluation de l'hépatotoxicité .....	143
III.2.4.1	Introduction .....	143
III.2.4.2	Le test MTT .....	144
III.2.4.3	Viabilité des hépatocytes HepG2 .....	144
III.2.5	Evaluation de l'inhibition des cholinestérases .....	146
III.2.5.1	Cholinestérases de source animale .....	147
III.2.5.2	Cholinestérases de source humaine .....	148
III.2.5.3	Cinétique enzymatique: mode d'inhibition de l'hybride <b>B8</b> sur l'hAChE .....	150
III.2.6	Evaluation de la neuroprotection .....	155
III.2.7	Viabilité des neuroblastomes SH-SY5Y seules .....	155
III.2.8	Viabilité des neuroblastomes SH-SY5Y en présence d'initiateurs de stress oxydant .....	156
III.2.9	Evaluation de la capacité antioxydante .....	157
III.2.9.1	Le test ORAC-FL .....	157
III.2.9.2	Résultats .....	159
III.2.10	Evaluation de l'inhibition de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ .....	160
III.2.10.1	Généralités .....	160
III.2.10.2	Résultats .....	161
III.2.11	Modélisation Moléculaire .....	162
III.2.11.1	Introduction .....	162
III.2.11.2	Docking des hybrides <b>B5</b> et <b>B8</b> .....	162



III.2.11.3	Prédiction in silico des propriétés ADMET .....	166
III.2.12	Conclusion sur la série <b>B</b> .....	172
III.3	Etude des hétérotrimères tacrine-mélatonine-acide antioxydant (série <b>C</b> )....	174
III.3.1	Introduction .....	174
III.3.2	Synthèse de la série <b>C</b> .....	175
III.3.3	Evaluation de l'hépatotoxicité.....	176
III.3.4	Evaluation de l'inhibition des cholinestérases .....	177
III.3.5	Evaluation de la capacité antioxydante.....	179
III.3.6	Conclusion sur la série <b>C</b> .....	180
III.4	Etude des hybrides donépézil-acide férulique (série <b>D</b> ) .....	182
III.4.1	Introduction .....	182
III.4.2	Synthèse de la série <b>D</b> .....	182
III.4.3	Evaluation de l'inhibition sur les cholinestérases .....	184
III.4.4	Evaluation de la capacité antioxydante.....	185
III.4.5	Conclusion sur la série <b>D</b> .....	186
III.5	Etude des dérivés chromone (série <b>E</b> ).....	187
III.5.1	Introduction .....	187
III.5.2	Synthèse de la série <b>E</b> .....	189
III.5.3	Evaluation de l'inhibition des cholinestérases .....	190
III.5.4	Evaluation de la capacité antioxydante.....	191
III.5.5	Conclusion sur la série <b>E</b> .....	192
CONCLUSION GÉNÉRALE .....		193
PARTIE EXPERIMENTALE.....		199
EXPERIMENTAL PART.....		199
RÉFÉRENCES.....		273

## LISTE DES ABRÉVIATIONS



[ <sup>11</sup> C]-PiB	[ <sup>11</sup> C]-Pittsburg Compound B
[ <sup>18</sup> F]-FDG	2-désoxy-2-[ <sup>18</sup> F]-fluoro-D-glucose
[BMIM]Br	Bromure de 1-butyl-3-méthylimidazolium
5-HT	Récepteur 5-hydroxytryptamine ou sétoninergique
7-MEOTA	9-Amino-7-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydroacridine
A	Absorbance
A1AcidG	Alpha-1-acid glycoprotein
A1AT	Alpha 1-antitrypsine
AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride
Aβ	Peptide β-amyloïde
ABAD	Aβ-binding alcohol dehydrogenase
ABC	ATP-binding cassette
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADMET	Absorption-distribution-métabolisation-excrétion-toxicité
AICD	Amyloid intracellular cytoplasmic/C-terminal domain
Ala	Alanine
Aph-1	Anterior pharynx-defective 1
ApoC3	Apolipoprotéine C-III
ApoE	Apolipoprotéine
APP	Amyloid-β precursor
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
ARE	Antioxydant response element
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Attenuated totale reflectance
AUC	Area under the curve
BACE-1	Beta-site APP cleaving enzyme 1
BHE	Barrière hématoencéphalique
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bs	broad singlet
BSA	Bovine albumin serum
BuChE	butyrylcholinestérase
BV	Basse vacante
CAS	Catalytic anionic site
Cat	Catalytique
CB	Récepteur cannabinoergique
CC4	Cc-4 protein
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDDO-Me	Triterpénoid bardoxolone méthyl ester
CDK-5	Cyclin-dépendant kinase 5

Chap	Chapitre
ChAT	Choline acétylcholinetransférase
CR1	Complement receptor 1
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
Cy	Cyclohexyle
Cyclo	Cyclohexane
Cys	Cystéine
D	Récepteur dopaminergique
d	doublet
DCM	Dichlorométhane
dd	doublet of doublet
DFT	Density functional theory
DHP	Dihydropyridine
DHPM	3,4-dihydropyrimin-2(1 <i>H</i> )-one
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisoproyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	Diphényl-2-picrylhydrazine
DTNB	acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide Ethylènediaminetétraacétique
<i>Ee</i> AChE	<i>Electricus electrophorus</i> acétylcholinestérase
EMEM	Eagle's minimum essential medium
eqBuChE	Butyrylcholinestérase équine
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Et	Ethyle
EtOH	Ethanol
EXSY	Exchange spectroscopy
FBS	Fetal bovine serum
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyle
FT-IR	Fourier transform Infrared spectroscopy
GABA	Récepteur acide $\gamma$ -aminobutyrique
gCOSY	Gradient correlated spectroscopy
GEA	Groupelement électroattracteur
gHMBC	Gradient heteronuclear multiple quantum correlation
gHSQC	Gradient heteronuclear single quantum correlation
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GPx	Gluthatione peroxydase
GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kinase-3 $\beta$
hAChE	Acétylcholinestérase humaine
HepG2	Lignée cellulaire d'hépatoblastomes humains
hERG	Human ether-a-go-go related gene
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
His	Histidine
HO	Haute occupée
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole

HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectroscopy
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
Ile	Isoleucine
IMCR	Isocyanide-based multicomponent reactions
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JMOD	J-modulated spin echo
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Keap1	Kelch ECH associating protein 1
LCR	Liquide céphalo-rachidien
m	multiplet
MA	Récepteur mono-aminergique
mAChR	Récepteur muscarinique
MAO	Monoamine oxydase
MAP	Microtubule associated proteins
MCR	Multicomponent reactions
MDCK	Madin-darby canine kidney
Me	Méthyle
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
Met	Méthionine
MMSE	Mini-mental state examination
MS	Molecular sieves
MTDL	Multi-target directed ligand
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
nAChR	Récepteur nicotinique
<i>n</i> Bu	<i>n</i> -Butyllithium
Nct	Nicastrine
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NMDA	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
NOS	Reactive nitrogen species
<i>n</i> Pr	<i>n</i> -Propyle
NQO1	NAD(P)H:quinone oxydoreductase
Nrf2	Nuclear E2-related factor
O/R	Oligomycine/roténone
OPHA	Oxidation-passerini-hydrolysis-alkylation
ORAC-FL	Oxygen radical absorbance capacity by fluorescence
P-3CR	Passerini three-component reaction
PADAM	Passerini reaction-amine deprotection-acyl migration
PAS	Peripheric anionic site
PBT2	2,2'-méthylène(8-hydroxyquinoline)
PDB	Protein data bank
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
Pen-2	Presenilin enhancer protein 2
Ph	Phényle

Phe	Phenylalanine
Picalm	Phosphatidyl binding clathrin assembly protein
PMB	<i>para</i> -Méthoxybenzyle
PP	Protéine phosphatase
Pro	Proline
PS	Présénilline
<i>p</i> -TsOH	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
q	quadruplet
quint.	quintuplet
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
$R_f$	Rapport frontal
RMC	Réactions multicomposants
RMCI	Réactions multicomposants basées sur les isonitriles
RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
ROESY	Rotating-frame NOE spectroscopy
ROS	Reactive oxygen species
RSA	Radical scavenging activity
s	singlet
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
Ser	Sérine
SH-SY5Y	Lignée cellulaire de neuroblastomes humains
$S_NAr$	Substitution nucléophile aromatique
SNC	Système nerveux central
t	triplet
TA	Température ambiante
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyle
TEA	Triéthylamine
TEBAC	Chlorure de triéthylbenzylammonium
TEMPO	2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy
TEP	Tomographie par émission de positrons
ThT	Thioflavine T
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Triméthylsilyle
TOCSY	Total correlated spectroscopy
TosMIC	Tosylméthylisonitrile
TPSA	Total polar surface area
Trp	Tryptamine
Ts	Tosyle
Tyr	Tyrosine
U-4CR	Ugi four-component reaction
UAC	Ugi-activation-cyclisation
UDAC	Ugi-deprotection-activation-cyclisation
UDC	Ugi-deprotection-cyclisation
UV	Ultra-violet

*À mes parents,  
À mes sœurs,  
À mon frère.*





# INTRODUCTION GÉNÉRALE



Au niveau du système nerveux central, les processus mnésiques et cognitifs conditionnent tout au long de notre vie, notre faculté à apprendre et à communiquer ainsi que notre développement psychomoteur.

Cependant, des dérèglements des capacités de mémorisation et d'apprentissage peuvent survenir avec l'âge. Ainsi, avec l'accroissement de l'espérance de vie dans le monde, nous assistons à une augmentation alarmante de la prévalence de pathologies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer chez les personnes âgées.

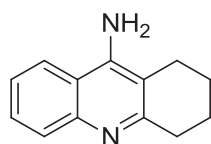
Cette maladie est caractérisée dans les cerveaux atteints, par la présence de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires formées respectivement du peptide  $\beta$  amyloïde et de la protéine tau hyperphosphorylée. De plus, l'interaction d'ions métalliques, tels que le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Fe}^{3+}$  ou le  $\text{Zn}^{2+}$  avec les plaques amyloïdes, est à l'origine de la production de radicaux libres responsables du stress oxydant dans le cortex cérébral. A ces observations histologiques, s'ajoute également la perte des neurones cholinergiques.

De nos jours, les médicaments disponibles sur le marché ne constituent que des traitements palliatifs qui soulagent temporairement les patients et permettent, au mieux, une meilleure prise en charge. En réponse à ce constat, un nombre croissant de recherches tentent de mieux comprendre les mécanismes biologiques reliés à la maladie d'Alzheimer dans l'espoir de développer de nouveaux outils thérapeutiques capables de stopper, voire d'inverser, le déclin cognitif et la perte de mémoire. Une de ces voies de recherche s'attaque au déficit cholinergique en ralentissant la dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur essentiel dans les processus de mémorisation, par inhibition réversible de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase.

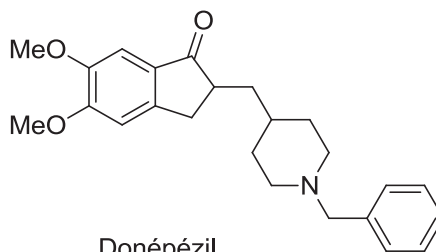
Le premier chapitre sera consacré à la présentation de la maladie d'Alzheimer. Nous retracerons brièvement son histoire et détaillerons les principales causes étiologiques de la maladie. Nous nous intéresserons ensuite aux différentes approches thérapeutiques actuellement étudiées comme les stratégies mono- et multi-cibles.

## Introduction générale

En outre, l'accent sera mis sur la stratégie multi-cibles où nous verrons quelques exemples de molécules hybrides issus de la modification chimique de deux anticholinestérasiques connus : la tacrine (Cognex®) et le donépézil (Aricept®).



Tacrine  
(Cognex®)



Donépézil  
(Aricept®)

Dans le deuxième chapitre, nous discuterons de la grande diversité chimique facilement accessible *via* les réactions multicomposants, et en particulier, *via* les réactions de Ugi et de Passerini. A travers divers exemples tirés de la littérature récente, nous verrons aussi qu'elles sont parfaitement adaptées pour la conception rapide de chimiothèques d'adduits capables d'interagir avec plusieurs causes étiologiques de la pathologie (approche multi-cibles).

Enfin, nous exposerons dans le troisième chapitre, la synthèse multicomposants et les évaluations pharmacologiques, physico-chimiques et toxicologiques de nos différentes séries d'adduits de Ugi et de Passerini portant différents motifs antioxydants (acides férulique/caféique/lipoïque, mélatonine, chromone) et inhibiteurs des cholinestérasés (tacrine, donépézil) :

- Les  $\alpha$ -acylaminocarboxamides prototypes (série **A**)
- Les hybrides tacrine-acide férulique (série **B**)
- Les hétérotrimères tacrine-mélatonine-acides antioxydant (série **C**)
- Les hybrides donépézil-acide férulique (série **D**)
- Les dérivés chromones (série **E**)

Ces séries ont été testées pour leur pouvoir anticholinestérasique (de différentes origines taxonomiques) et antioxydant. L'hépatotoxicité des séries **B** et **C**, portant un fragment

tacrine, a été évaluée sur les cellules HepG2. Par ailleurs, l'étude de la série **B** a été complétée par d'autres tests : étude conformationnelle en RMN, cinétique enzymatique, neuroprotection sur les cellules SH-SY5Y, inhibition de l'auto-agrégation du peptide  $\beta$  amyloïde, docking et ADMET.

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration avec plusieurs laboratoires européens :

- Prof. José Luis Marco-Contelles, membre du comité de suivi de thèse, IQOG (CSIC), Madrid, Espagne.
  
- Etudes toxicologiques et de neuroprotection sur les cellules HepG2 et SH-SY5Y :  
Dr. Alejandro Romero, Département de Toxicologie et de Pharmacologie, Université Complutense de Madrid, Espagne.  
Dr. Manuela G. López et Dr. Javier Egea, Instituto Teófilo Hernando, Université Autonome de Madrid, Espagne.
  
- Inhibition des cholinestérases humaines, cinétique enzymatique et inhibition de l'agrégation du peptide  $\beta$  amyloïde :  
Dr. Manuela Bartolini, Département de Pharmacie et de Biotechnologie  
Prof. Vincenza Andrisano, Département d'Études sur la Qualité de Vie  
Université de Bologne, Italie.
  
- Etude conformationnelle en RMN :  
Dr. María-Luisa Jimeno, CENQUIOR (CSIC), Madrid, Espagne.
  
- Modélisation moléculaire :  
Dr. Elena Soriano, SEPCO (CSIC), Madrid, Espagne.  
Prof. Dr. Michael Decker et Sarah Wehle, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Allemagne.

Pour clore ce manuscrit, nous concluons sur les résultats obtenus et discuterons des différentes perspectives de recherches.



# CHAPITRE I

## La maladie d'Alzheimer : Étiologie et approches thérapeutiques





# I. Historique de la maladie d'Alzheimer

## I.1 Découverte

En 1906, Auguste D. fut la première personne atteinte d'un état de démence sénile jamais répertorié auparavant. Elle présentait une dégradation progressive de ses capacités cognitives incluant des troubles mnésiques et comportementaux. Ce diagnostic fut établi par un neuropsychiatre allemand, le Dr. Aloïs Alzheimer. Par la suite, cette maladie portera son nom (Figure I.1).<sup>1</sup>



Figure I.1. Dr. Aloïs Alzheimer (à gauche)<sup>2</sup> et sa patiente Auguste D. (à droite).<sup>3</sup>

En effectuant une autopsie de son cerveau, il identifie en plus d'une atrophie sévère, deux facteurs histologiques caractéristiques de cette maladie: des «plaques» et des dégénérescences neurofibrillaires (Figure I.2).<sup>4</sup>



Figure I.2. Croquis dessiné par Alzheimer représentant des dégénérescences neurofibrillaires.<sup>5</sup>

Les « plaques » dites « plaques séniles » sont composées de dépôts extracellulaires de peptides neurotoxiques. Les dégénérescences neurofibrillaires correspondent à une accumulation de fragments de protéines fibreuses dans les cellules nerveuses.

Durant la première moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, les recherches menées se focalisaient essentiellement sur le lien qui pouvait exister entre vieillesse et démence sénile ainsi une controverse clinique émergea autour de la question de savoir si les démences « pré-sénile » et « sénile » constituaient une même neuropathologie.<sup>6</sup>

Ce n'est que dans les années 1960, que la recherche sur la maladie d'Alzheimer pris son véritable essor avec l'émergence de nouveaux outils de recherche tels que le microscope électronique ou les différentes méthodes d'analyses histologiques et biochimiques. Une corrélation a pu être établie entre la dégradation des capacités cognitives et mentales et le nombre plaques séniles dans le cerveau. On a alors identifié le peptide  $\beta$ -amyloïde (noté A $\beta$ ) et la protéine tau hyperphosphorylée qui constituent respectivement les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires. Dès lors, les connaissances sur la genèse et le développement de la maladie d'Alzheimer n'ont cessé d'évoluer. Les chercheurs se sont penchés également sur l'aspect biochimique de la pathologie et principalement sur le rôle des neurotransmetteurs. Ils découvrent ainsi qu'un déficit en acétylcholine pouvait accélérer le déclin cognitif.<sup>7</sup>

Cette maladie dévastatrice est considérée comme la neuropathologie la plus commune affectant les personnes âgées. En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre de patients atteints par la maladie d'Alzheimer ne fait que s'accroître dans le monde. Les femmes représentent 60 % des personnes touchées par la maladie, tout âge confondu. Globalement, les estimations considèrent que le nombre de cas pourrait atteindre 107 millions en 2050.

En France, ce sont 850 000 personnes malades, soit l'équivalent de la population de Marseille. Si rien ne change durant les prochaines années, un Français sur quatre de plus de 65 ans sera touché par la maladie d'Alzheimer en 2020.<sup>8</sup> La maladie d'Alzheimer constitue ainsi un problème majeur de santé public.

## I.2 Symptômes cliniques et diagnostic

### I.2.1 Symptômes cliniques

La maladie d'Alzheimer provoque progressivement une atrophie cérébrale principalement dans deux zones du cerveau : le lobe temporal et l'hippocampe. Ces zones jouent un rôle primordial dans différents processus tels que la mémoire, le langage ou bien la capacité à coordonner ses mouvements. Même si l'on ne connaît pas encore comment se déclenche la maladie, il semble que les lésions au cerveau débutent des décennies avant que le diagnostic ne soit établi.

La progression de la maladie peut être présentée en trois stades :

- **Le stade précoce :** Au début de la pathologie, le malade éprouve des pertes de mémoires épisodiques souvent attribuées au stress quotidien ou chez les personnes âgées, au processus normal de vieillesse.
- **Le stade modéré :** Plus la maladie progresse, plus les changements comportementaux deviennent manifestes. Le malade a de plus en plus besoin d'aide pour gérer les différents aspects de sa vie quotidienne comme se rappeler d'un rendez-vous, organiser des tâches ou tout simplement, s'habiller. Il commence également à oublier les noms et peut parfois avoir des difficultés à reconnaître une personne. Ces troubles plongent progressivement le malade dans la dépression.
- **Le stade sévère :** A ce stade, le cerveau du malade est sérieusement atteint, le malade devient alors totalement dépendant des autres pour vivre et éprouve de grandes difficultés à communiquer. Il perd graduellement la mobilité de ses membres et reste généralement alité jusqu'à son décès.

Les stades se succèdent dans le temps, cependant il n'est pas possible de délimiter une frontière nette entre chaque stade et leur durée varie d'un patient à l'autre.

## I.2.2 Diagnostic

Dans cette section, nous nous pencherons sur les différentes méthodes de diagnostic qui sont utilisés de nos jours. Ces méthodes se basent sur des tests neuropsychologiques et sur des techniques d'analyses biologiques et d'imageries utilisant des biomarqueurs connus dans la maladie d'Alzheimer.

### *I.2.2.1 Tests neuropsychologiques*

De nombreux bilans neuropsychologiques ont été mis au point afin d'évaluer les fonctions cognitives et mnésiques tels que le langage, la praxie, la gnose, les fonctions exécutives ou bien le raisonnement.

L'évaluation la plus répandue est celle du test de Folstein appelé aussi Mini Mental State Examination (MMSE).<sup>9</sup> Ce test est constitué de 30 questions et dure 10 minutes. Si le score est inférieur à 24, un état de démence est soupçonné. Cependant, l'interprétation des résultats ne doit pas être définitive car le score peut éventuellement être faussé par le niveau intellectuel du patient.

Un recoupement avec d'autres tests est nécessaire pour valider le diagnostic. Parmi ceux-ci, on peut citer le test RL/RI-16 items (évaluation de la mémoire verbale) et le test DMS 48 (évaluation de la mémoire visuelle).<sup>10</sup>

### *I.2.2.2 Biomarqueurs dans la maladie d'Alzheimer*

Un biomarqueur est un paramètre physiologique, biochimique ou anatomique qui peut être objectivement mesuré comme l'indicateur d'un processus biologique donné.

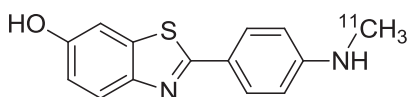
Dans la maladie d'Alzheimer, les biomarqueurs peuvent être mis en évidence par des examens biologiques, IRM (Imagerie à Résonance Magnétique) ou examen tomodensitométrie cérébrale. Une dernière technique peut être utilisée pour mesurer le métabolisme cérébral, la TEP (Tomographie par émission de Positons).<sup>11</sup>

De nos jours, 5 biomarqueurs assez bien connus dans la maladie d'Alzheimer peuvent servir de critère de diagnostic avancé. Les deux premiers correspondent à la quantification des protéines amyloïdes et tau présentes dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), les 3 derniers biomarqueurs sont obtenus par différentes techniques de neuro-imagerie.<sup>12</sup>

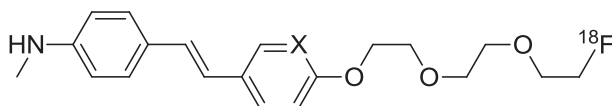
Ces 5 biomarqueurs peuvent être subdivisés en deux catégories majeures :

- **Biomarqueurs de la déposition de plaques amyloïdes :** Dans cette première catégorie, on mesure la quantité de peptide  $\beta$ -amyloïde libre dans le LCR (qui diminue avec l'accroissement des plaques amyloïdes) et/ou on visualise les plaques amyloïdes par TEP à l'aide de radiotraceurs tel que le [ $^{11}\text{C}$ ]-Pittsburg Compound B ([ $^{11}\text{C}$ ]-PiB), le [ $^{18}\text{F}$ ]-Florbetapir (Amyvid® ou  $^{18}\text{F}$ -AV-45) ou le [ $^{18}\text{F}$ ]-Florbetapen (Neuraceq™). Ces deux marqueurs imagés, sont corrélés lorsqu'ils sont mesurés chez le même patient. De plus, la validité de ces biomarqueurs a été établie par des études histologiques de cerveaux malades *post-mortem* (Figure I.3).

**Exemples de radiotraceurs utilisés pour la détection de plaques amyloïdes en TEP :**



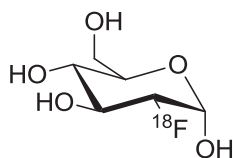
X = H, [ $^{11}\text{C}$ ]-Pittsburgh Compound B ou [ $^{11}\text{C}$ ]-PiB



X = N, [ $^{18}\text{F}$ ]-Florbetapir (Amyvid®)

X = CH, [ $^{18}\text{F}$ ]-Florbetapen (Neuraceq™)

**Exemple de radiotracteur utilisé pour l'étude du métabolisme cérébral en TEP :**



2-Désoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluoro-D-glucose ou [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG

Figure I.3. Différents types de radiotraceurs utilisés en neuro-imagerie.

- **Biomarqueurs de la neurodégénérescence :** La seconde catégorie concerne l'évaluation de la perte des neurones cholinergiques, notamment dans l'hippocampe. Ces biomarqueurs sont les niveaux élevés de protéine tau (native et hyperphosphorylée), la perte de matière grise décelée par IRM et l'hypo-métabolisation du 2-désoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluoro-D-glucose ([ $^{18}\text{F}$ ]-FDG) par TEP. Comme pour la première catégorie, ces biomarqueurs ont été reconnus comme valides suite à l'autopsie (Figure I.4).

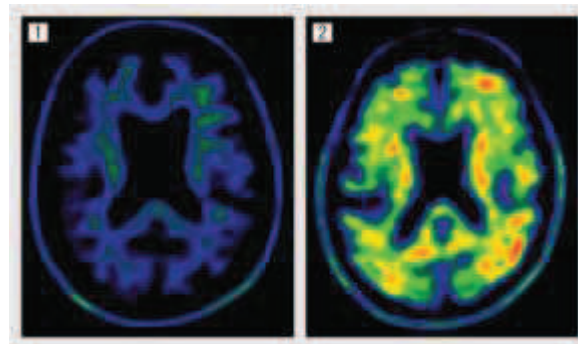


Figure I.4. Image 1 : Etude TEP d'un patient âgé ne présentant aucun signe de dépôt de plaques séniles. Image 2 : Etude TEP d'un patient présentant les symptômes de la maladie d'Alzheimer. Les zones rouges correspondent à une co-localisation du radiotraceur avec les plaques amyloïdes.<sup>13</sup>

Plus récemment, des chercheurs ont identifié 10 protéines (ApoC3, transthyréline, A1AT, PEDF, CC4, ICAM-1, RANTES, A1AcidG, cystatine et clustérine) dans le sang qui pourraient servir de biomarqueurs pour diagnostiquer précocement la maladie d'Alzheimer. Ces biomarqueurs permettent d'évaluer le risque, d'une personne déjà atteinte de troubles mnésiques et cognitifs, de contracter la maladie d'Alzheimer.<sup>14</sup> Ces résultats encourageants vont permettre dans le futur, un diagnostic plus rapide et plus fiable de la pathologie.<sup>15</sup>

## II. Etiologie

L'étiologie de la maladie d'Alzheimer n'est pas complètement connue, cependant plusieurs hypothèses étiologiques ont été proposées et font la lumière sur une partie des mécanismes de la maladie. Nous pouvons citer la cascade amyloïde (formation de plaques amyloïdes), l'hypothèse cholinergique (déficit en acétylcholine, ACh), les dégénérescences neurofibrillaires (agrégation de la protéine tau hyperphosphorylée), le stress oxydant, l'excitotoxicité de certains neurotransmetteurs comme le glutamate, la dyshoméostasie du calcium. A cette physiopathologie s'ajoute les facteurs de risques environnementaux et génétiques.<sup>16</sup> Ce réseau complexe d'évènements, interconnectés et impliqués dans la mort neuronale, fait de la maladie d'Alzheimer une pathologie neurodégénérative multifactorielle. La partie suivante décrit succinctement ces diverses voies et les mécanismes responsables de cette physiopathologie si particulière (Schéma I.1).

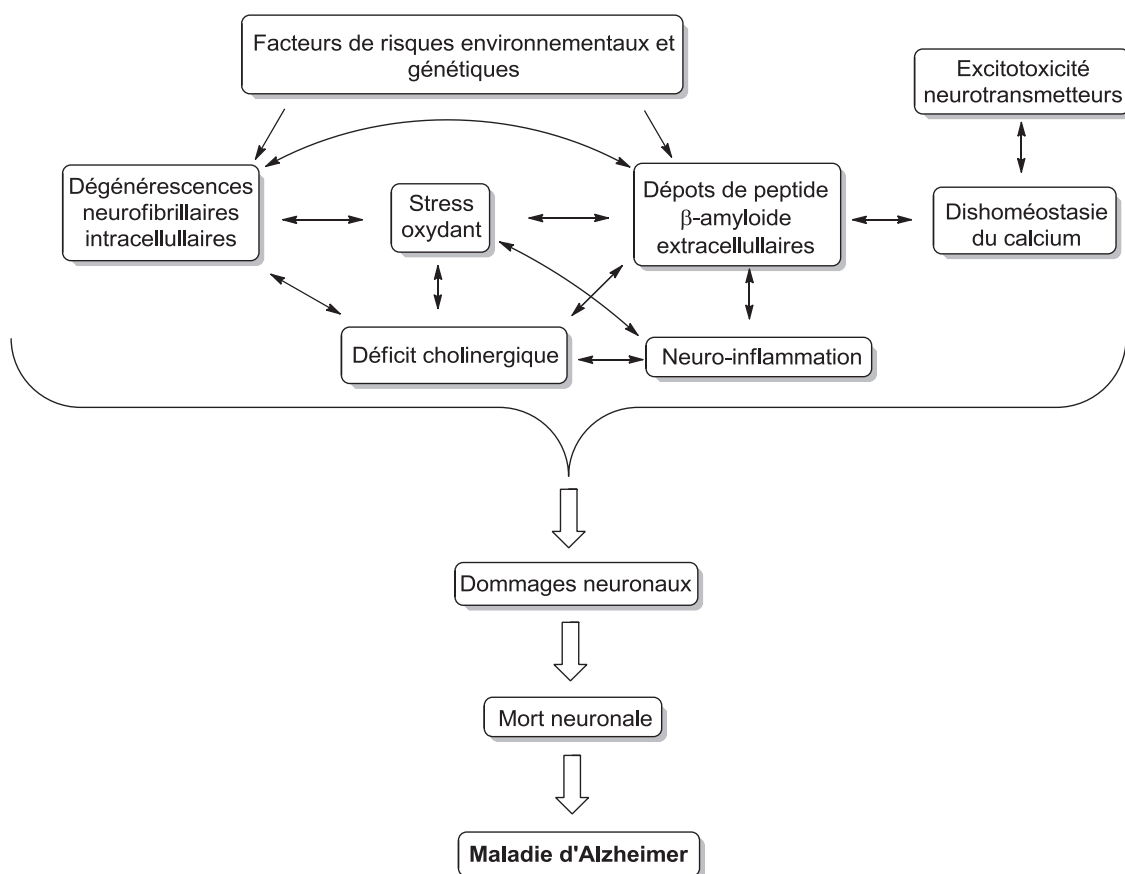


Schéma I.1. Interconnexions entre les différents facteurs étiologiques majeurs de la maladie d'Alzheimer.



## II.1 Facteurs de risques génétiques

Nous nous intéresserons dans cette partie aux facteurs de risques génétiques qui peuvent intervenir dans la maladie d'Alzheimer. Plus précisément, nous décrirons brièvement les facteurs de risques génétiques présents dans les formes familiales précoces et dans les formes tardives de la pathologie.<sup>17</sup> D'autres facteurs de risques, liés à l'environnement et au mode de vie, sont décrits dans la littérature, mais encore débattus. Outre l'âge avancé, on peut citer le manque de stimulation intellectuelle et d'exercice physique,<sup>18</sup> les microtraumatismes crâniens à répétition,<sup>19</sup> l'obésité ou bien encore le diabète.<sup>20</sup>

### II.1.1 Formes familiales précoces

Environ 5 % des cas déclarés de maladie d'Alzheimer sont dus à l'hérédité. Ces formes familiales se caractérisent par une transmission autosomique dominante, c'est-à-dire que la propagation génétique ne touche qu'un sujet sur deux à chaque génération. Ces formes rares sont caractérisées par un déclenchement précoce de la maladie (avant 60 ans).<sup>21</sup>

La majorité de ces formes familiales précoces sont causées par des mutations sur les trois gènes suivants :

- **Le gène Amyloid- $\beta$  Protein Precursor (APP)** : Situé sur le chromosome 21, il code pour la protéine glycosylée transmembranaire Amyloid- $\beta$  Protein Precursor (APP) de 770 acides aminés. Cette protéine contient à la jonction de ses domaines membranaires et extracellulaires, les séquences peptidiques correspondant aux différents types de peptide A $\beta$  (plus de détails sur le peptide A $\beta$  seront apportés à la section II.2. de ce chapitre). La mutation APP la plus connue est la double mutation suédoise sur les codons 670/671.
- **Le gène Préséniline 1 (PS1)** : situé sur le chromosome 14, il code pour une protéine membranaire de 467 acides aminés comportant 7 à 9 domaines transmembranaires et une grande boucle hydrophile située entre le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> domaine transmembranaire. La protéine PS1 fait partie du complexe  $\gamma$ -sécrétase

intramembranaire, impliqué dans la production de peptide A $\beta$ . Depuis la découverte de ce gène, 185 mutations différentes affectant 405 familles ont été recensés.

- **Le gène Préséniline 2 (PS2)** : situé sur le chromosome 1, il présente une forte homologie de séquence en acides aminés (67%) avec le gène PS1. Comme pour la protéine PS1, la protéine PS2 fait également partie du complexe  $\gamma$ -sécrétase. A ce jour, seules 13 mutations faux-sens ont été décrites chez 22 familles.

### II.1.2 Formes tardives

Les formes tardives, appelées également formes sporadiques, constituent la grande majorité des cas recensés. A côté des gènes impliqués dans la transmission héréditaire (APP, PS1, PS2), un 4<sup>ème</sup> gène est impliqué dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit du gène Apolipoprotéine E (ApoE), situé sur le chromosome 19. Ce gène code pour une protéine de 299 aminocides et se diversifie sous la forme de trois allèles chez l'homme :  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4. Ces gènes (ApoE  $\epsilon$ 2, ApoE  $\epsilon$ 3, ApoE  $\epsilon$ 4) codent pour trois protéines ApoE isoformes E2, E3 et E4, qui sont responsables du transport des lipides dans le sang (Schéma I.2).

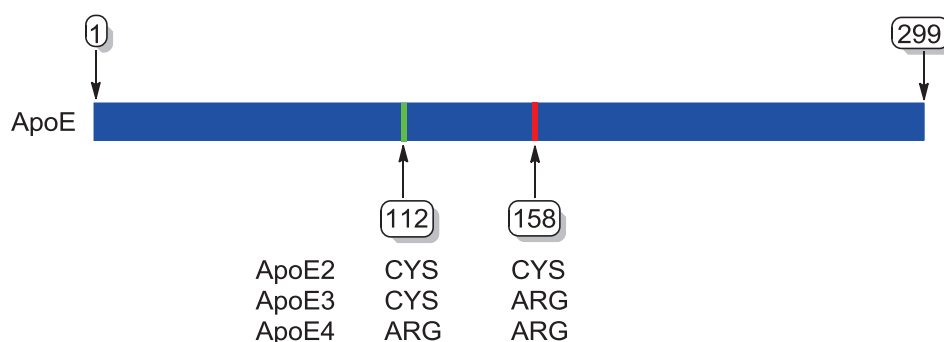


Schéma I.2. Les 3 isoformes de l'ApoE : E2, E3 et E4.

Les protéines ApoE2 et ApoE3 participent au développement neuronal en apportant les lipides nécessaires à la maturation des neurones. A l'inverse, l'ApoE4 est décrite comme neurotoxique *in vitro* et provoque les dégénérescences neurofibrillaires. Or, dans la maladie d'Alzheimer, la prévalence de l'allèle  $\epsilon$ 4 est très élevée (35 à 40%) chez les malades. L'allèle

$\epsilon 4$  peut donc être considéré comme la variante de séquence ApoE la plus importante favorisant le risque d'apparition tardive de la maladie d'Alzheimer.

Plus récemment, trois autres gènes ont été décrits comme facteurs de risques supplémentaires dans les formes tardives de la maladie. Par souci de clarté, ils ne seront que simplement cités dans ce manuscrit, il s'agit de Picalm (*Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*),<sup>22</sup> du récepteur du complément CR1<sup>23</sup> et de la Clusterine.<sup>24</sup>

## II.2 Les plaques séniles ou plaques amyloïdes

L'hypothèse amyloïde a été proposée il y a plus de 20 ans pour expliquer une partie de l'étiologie de la maladie.<sup>25,26</sup> Constituant une des principales observations histologiques, les plaques amyloïdes sont des dépôts extracellulaires de peptide A $\beta$ , résultant de deux clivages enzymatiques de la protéine APP par les sécrétases ( $\beta$ ,  $\gamma$ ). Ces dépôts sont neurotoxiques et conduisent irrémédiablement à la mort neuronale.<sup>27</sup>

### II.2.1 Le peptide $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ )

L'A $\beta$  est un peptide qui peut être constitué de 28 à 43 acides aminés. Il est issu de la coupure enzymatique de l'APP par les sécrétases ( $\beta$ ,  $\gamma$ ). Comme cité dans la partie II.1.1. du présent chapitre, l'APP est une protéine transmembranaire qui suit deux voies protéolytiques :

- **La voie amyloïdogénique** : Dans cette voie, l'APP est clivée par la  $\beta$ -sécrétase (appelé aussi Memapsin-2 ou *Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1*, BACE-1). Deux fragments sont alors formés : la protéine sAPP $\beta$  libre et le fragment protéique transmembranaire C99. sAPP $\beta$  est soluble et non toxique. Le peptide C99 est par la suite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase et conduit à la formation de l'A $\beta$  et d'un fragment résiduel nommée AICD (*Amyloid Intracellular Cytoplasmic/C-terminal Domain*). Cette voie, impliquant le clivage par la  $\beta$ -sécrétase, est plus favorisée par la mutation de l'APP dans le cas de formes familiales précoces de la pathologie (Schéma I.3).

- **La voie non amyloïdogénique** : La deuxième possibilité de clivage de l'APP est la protéolyse par l' $\alpha$ -sécrétase (appelé aussi ADAM10). Celle-ci est clivée dans la portion de séquence peptidique appartenant à l'A $\beta$  du fragment C83. Elle produit alors les fragments sAPP $\alpha$ , p3 (noté aussi A $\beta$ <sub>17-42</sub>) et l'AICD. Il a été démontré que le fragment sAPP $\alpha$  pouvait avoir des effets neurotrophiques bénéfiques en stimulant les systèmes cholinergique, glutamatergique et GABAergique.<sup>28</sup> La stimulation de la voie de l' $\alpha$ -sécrétase pourrait, à l'avenir, devenir une voie thérapeutique.<sup>29</sup> Quant au fragment p3, son rôle est encore discuté et certains résultats d'études sur ce peptide se sont révélés être contradictoires (Schéma I.3).

30,31

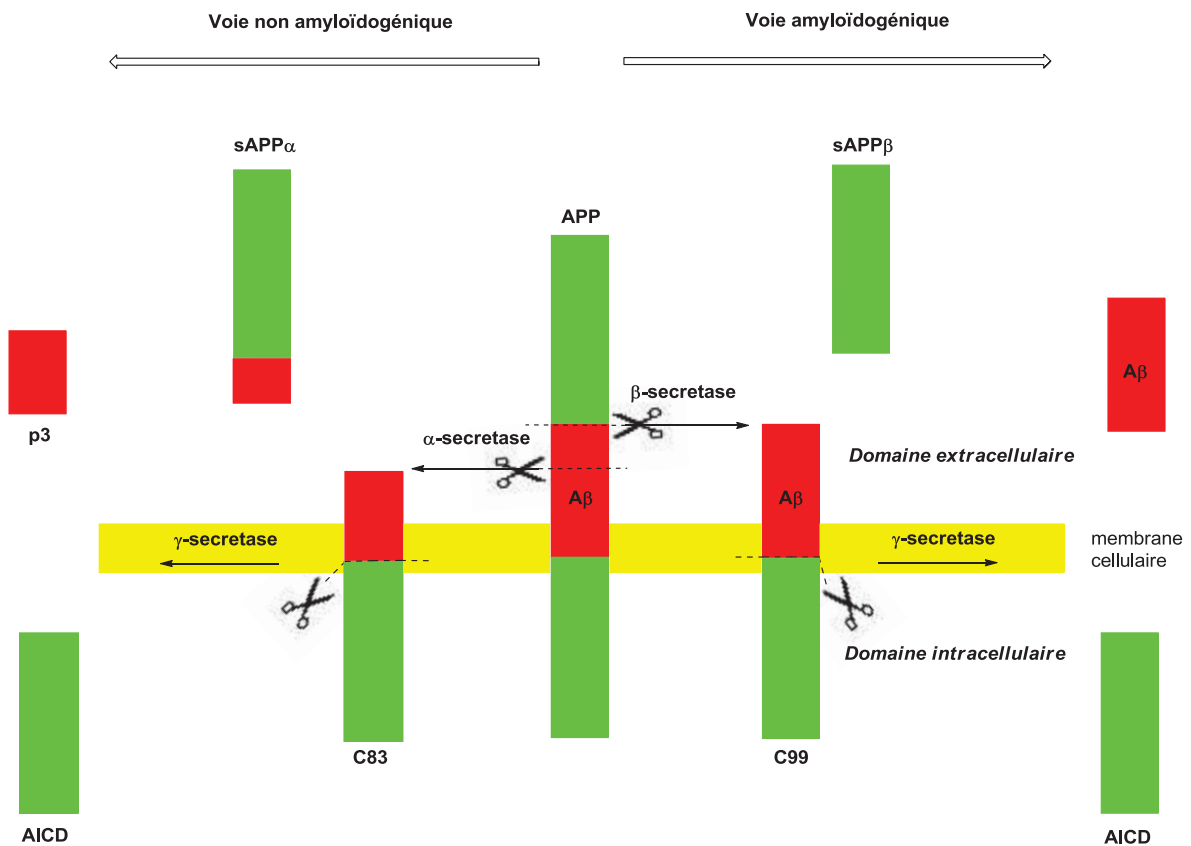


Schéma I.3. Les voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique.<sup>32</sup>

## II.2.2 Agrégation du peptide $\beta$ -amyloïde

Nous avons vu précédemment que le clivage de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase génère le peptide A $\beta$  (voie amyloïdogénique). Chez l'homme, deux formes sont prépondérantes. Il s'agit de A $\beta_{1-40}$  et A $\beta_{1-42}$ , composées respectivement de 40 et 42 acides aminés.

Bien que la concentration en A $\beta_{1-40}$  reste environ 5 fois plus élevée que celle de A $\beta_{1-42}$ . Ce dernier est souvent considéré comme la séquence A $\beta$  la plus importante dans la pathologie. Notamment, à cause de sa cinétique d'agrégation *in vitro* et sa forte concentration dans les tissus cérébraux chez les personnes ayant une prédisposition génétique (mutations).<sup>33</sup>

D'autres études récentes ont également mis en avant le rôle des transporteurs à efflux ABC (*ATP-Binding Cassette*), au niveau de la barrière hématoencéphalique (BHE), dans la régulation de la production et la clairance du peptide A $\beta$  dans le système nerveux central. Pour plus de clarté, ces études sur ces transporteurs ABC ne seront pas explicités ici, cependant, leur implication dans la maladie d'Alzheimer sont résumés dans la revue de Abuznait *et al.*<sup>34</sup>

L'agrégation se déroule en trois temps. D'abord, les peptides monomères forment des oligomères A $\beta$  qui s'associent ensuite pour former des fibrilles insolubles. Enfin, ces derniers s'accumulent davantage pour constituer les plaques amyloïdes (Schéma I.4).

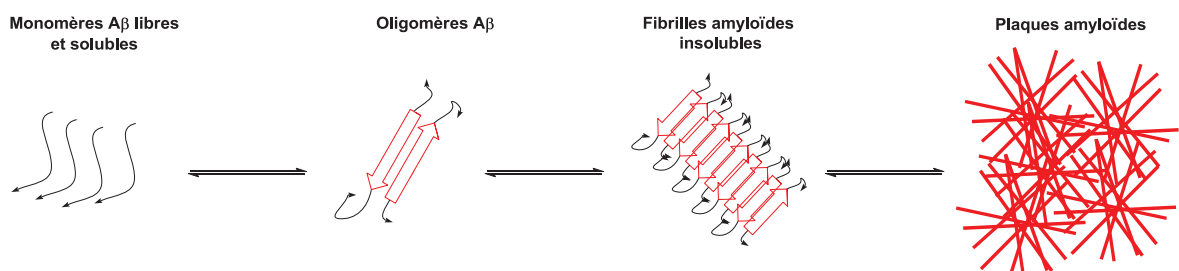


Schéma I.4. Formation des plaques amyloïdes.<sup>35</sup>

La présence de plaques amyloïdes déclenche une cascade de processus néfastes pour les neurones. Ils sont impliqués dans l'augmentation du stress oxydant due à leurs interactions

avec certains métaux présents dans le cerveau (tel que le cuivre ou fer) et dans la perturbation de l'homéostasie du calcium en favorisant son entrée dans les neurones. Ils favoriseraient également l'hyperphosphorylation de la protéine tau et l'agrégation du peptide A $\beta$  peut être accélérée par les enzymes cholinestérases (acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase).

### II.3 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires constituent l'autre observation histologique majeure de la maladie d'Alzheimer. Elles sont composées de paires de filaments hélicoïdaux de protéines tau hyperphosphorylées. Celles-ci constituent des dépôts intracellulaires dans la maladie d'Alzheimer.<sup>36</sup>

#### II.3.1 La protéine tau

Le rôle de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer a été démontré pour la première fois en 1985 par des chercheurs belges. Ceux-ci ont constaté que les protéines tau hyperphosphorylées co-localisent exactement dans les zones où s'accumulent les neurofibrilles.<sup>37</sup>

La protéine tau (*tubulin associated unit*) est un membre de la famille des protéines associées aux microtubules (*Microtubule Associated Proteins*, MAP). C'est une phosphoprotéine, de 352 à 441 acides aminés, possédant plusieurs sites de phosphorylation et largement exprimée dans le cerveau. La principale fonction de la protéine tau est de maintenir la stabilité des microtubules (filaments du cytosquelette) au niveau des axones. Elle sert aussi au transport intracellulaire des organites et à l'organisation spatiale de la cellule (Figure I.5).

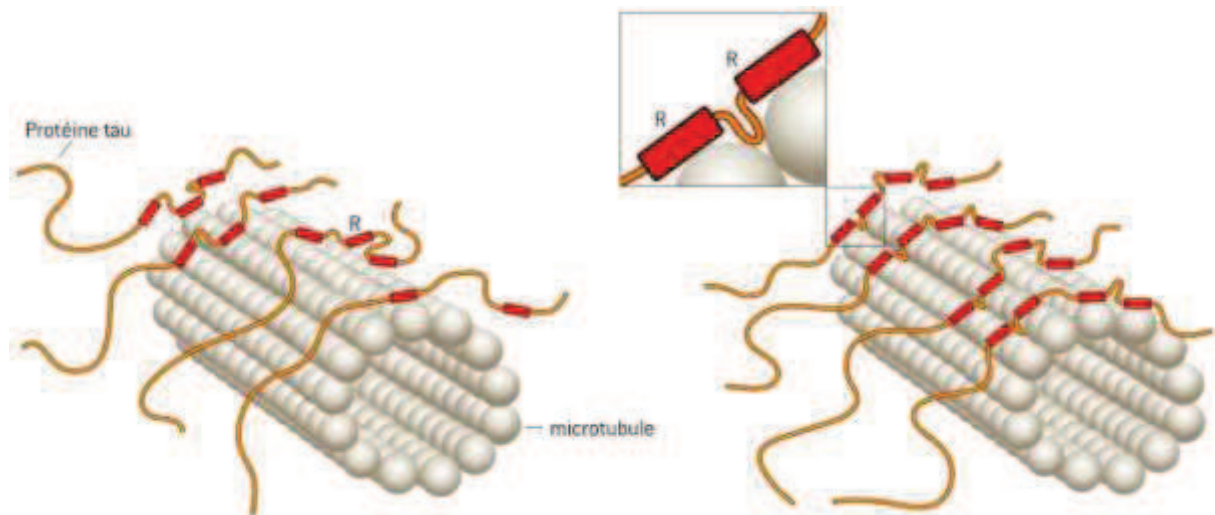


Figure I.5. Les formes 3R (à gauche) et 4R (à droite) de la protéine tau.<sup>38</sup>

Il existe 6 isoformes de la protéine tau codées à partir du gène tau correspondant situés sur le chromosome 17. Ces six variantes se différencient par la répétition d'un motif particulier, noté R. Trois isoformes répètent le domaine R trois fois et sont appelées 3R, les 3 autres le répètent quatre fois et sont appelées 4R. Ces motifs R servent de point d'ancrage au microtubule. L'isoforme 4R présente une interaction plus forte avec les microtubules en les consolidant et en donnant des prolongements plus longs et plus rigides.

### II.3.2 Hyperphosphorylation de la protéine tau et son agrégation

Nous avons vu précédemment que les dégénérescences neurofibrillaires étaient formées d'enchevêtrements intracellulaires de protéines tau hyperphosphorylées.

En temps normal, l'état de phosphorylation de tau est régulé par différentes protéines kinases et protéines phosphatases. Ces enzymes maintiennent un équilibre qui permet à tau de jouer correctement son rôle de gaine pour les microtubules. Or, dans la maladie d'Alzheimer, l'activité des protéines phosphatases (Protéines Phosphatases 1 et 2A (PP-1 et PP-2A)) diminue d'environ 20 à 30 %.<sup>39</sup> Cela crée un déséquilibre en faveur de certaines kinases qui hyperphosphorylent tau. Parmi ces kinases, on peut citer la Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), la protéine kinase-5 cycline-dépendante (*Cyclin-Dependant Kinase 5*, CDK5) ou les kinases ERK 1/2 associées aux microtubules (*Mitogen Activated protein (MAP)*

*Kinase ERK 1/2*). Cette hyperphosphorylation conduit tau à se détacher des microtubules et à sa réorganisation sous la forme de neurofibrilles torsadées intracellulaires.<sup>40</sup>

Par ailleurs, il a été prouvé que certaines kinases (GSK-3 $\beta$ , CDK5, ERK2) pouvaient être activées par ApoE et A $\beta$  pour conduire *in fine* à l'hyperphosphorylation de tau.<sup>41,42</sup> Il existe donc un lien étiologique entre la cascade amyloïde et les dégénérescences neurofibrillaires.<sup>43–45</sup>

## II.4 La neurotransmission

La neurotransmission est un processus par lequel un influx nerveux est délivré entre deux neurones *via* un interval appelé fente synaptique. Les entités chimiques capables de transmettre cette information nerveuse sont appelés neurotransmetteurs. Nous nous focaliserons dans cette partie sur les neurotransmissions cholinergique et glutamatergique car ces voies font partie intégrante de l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. D'autres types de neurotransmission sont aussi impliqués mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Leur modulation pourrait améliorer la cognition et la mémoire. On peut citer les neurotransmissions sérotoninergiques (5-HT),<sup>46</sup> monoaminergiques (MA),<sup>47</sup> dopaminergiques (D),<sup>48</sup> GABAergiques (GABA),<sup>49</sup> histaminergiques (H),<sup>50</sup> ou encore, cannabiniergiques (CB).<sup>51</sup>

### II.4.1 La neurotransmission cholinergique

Dans le cas des neurones cholinergiques, l'acétylcholine (ACh) joue le rôle de neurotransmetteur. Comme rappelé précédemment, une carence en ACh est une caractéristique importante de la maladie d'Alzheimer.

L'ACh est produite dans les neurones cholinergiques pré-synaptiques, à partir de la choline et l'acétylcoenzyme A, par la choline acétyltransférase (ChAT). Celle-ci est par la suite délivrée dans la fente synaptique où elle se fixe aux différents récepteurs muscariniques (mAChR) et nicotiques (nAChR) qui peuplent les neurones cholinergiques post-synaptiques. Une dépolarisation se déclenche alors pour transmettre l'influx nerveux et l'ACh est aussitôt



dégradée par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) en choline laquelle est par la suite recyclée.

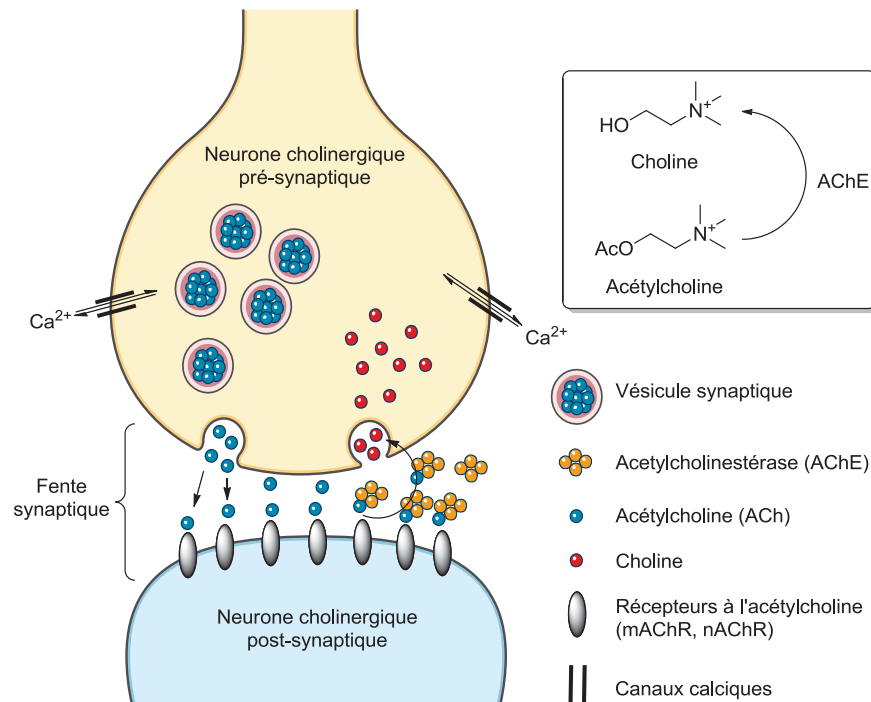


Schéma I.5. Neurotransmission cholinergique.

#### II.4.2 Les cholinestérases

Il existe deux types d'enzymes cholinestérases :

- **L'Acétylcholinestérase** (AChE, EC 3.1.1.7), appelé aussi *cholinestérase*, *érythrocyte cholinestérase* ou encore, *acetylcholine acétylhydrolase*, se retrouve principalement dans le sang ainsi qu'au niveau des synapses de neurones cholinergiques.
- **La Butyrylcholinestérase** (BuChE ou BChE, EC 3.1.1.8), appelé aussi *pseudocholinestérase*, *plasma cholinestérase* ou encore, *acylcholine acylhydrolase*, se retrouve principalement dans le foie.

Ces deux enzymes dégradent l'ACh, cependant, la BuChE peut métaboliser d'autres substrats non-endogènes tels que la butyrylcholine (BuCh) ou certains curares (succinylcholine, mivacurium).

#### II.4.2.1 L'Acétylcholinestérase

L'AChE est une sérine hydrolase dont l'implication est très importante dans la régulation de la neurotransmission cholinergique dans toutes les régions du cerveau. D'un point de vue purement structurel, des études de diffractions aux rayons X ont montré que l'AChE humaine (hAChE) est composée de deux sites principaux d'interactions<sup>52-54</sup> :

- **Le site catalytique anionique (*Catalytic Anionic Site, CAS*)** comprenant la triade catalytique Ser203-His447-Glu334 qui hydrolyse l'acétylcholine et le résidu clé Trp86 qui forme une interaction cation- $\pi$  avec l'ammonium quaternaire de l'ACh.
- **Le site périphérique anionique (*Peripheric Anionic Site, PAS*)** se situe, quant à lui, à l'entrée d'une gorge hydrophobe longue de 20 Å menant au CAS et comprend des acides aminés hydrophobes dont les résidus clés sont Trp286 et Tyr72. Le PAS permet « d'attirer » l'acétylcholine (par interaction cation- $\pi$  avec Trp286) vers le CAS où elle est hydrolysée (Schéma I.6).

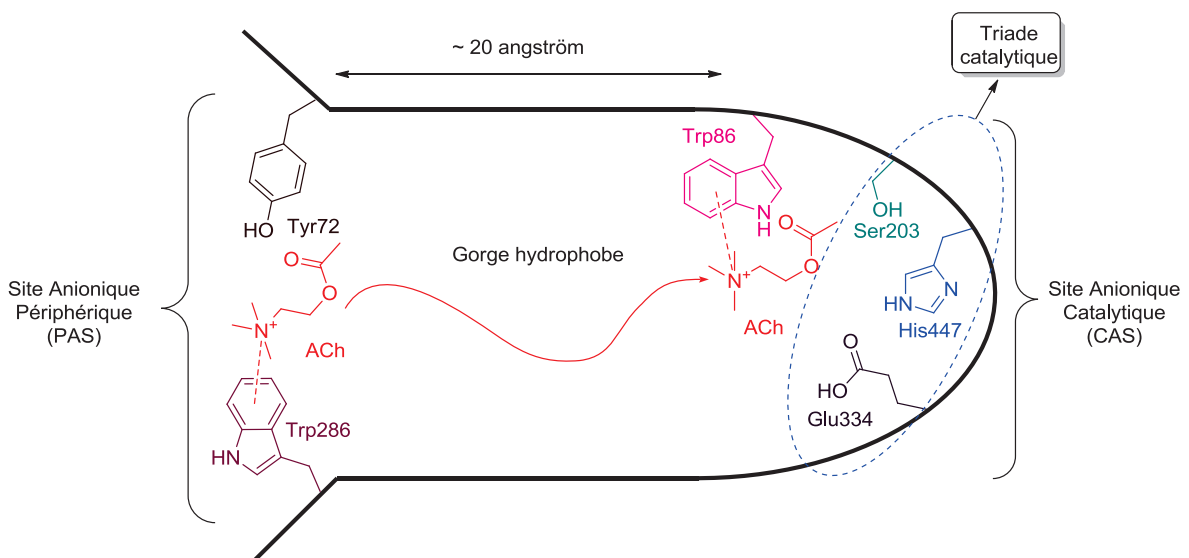


Schéma I.6. Principaux sites d'interactions de l'hAChE.

Comme rappelé précédemment, une des caractéristiques principales de la maladie d'Alzheimer est l'atrophie du cortex cérébral. Celle-ci est notamment due à une perte

massive de neurones cholinergiques et s'accompagne au niveau biochimique, d'une diminution de l'expression de la ChAT et par conséquent, de l'ACh.<sup>55</sup>

Pour doper le système cholinergique, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été conçues ; comme la modulation de la sécrétion de l'ACh ou la stimulation agoniste des récepteurs muscariniques (mAChR) et nicotiniques (nAChR) post-synaptiques. Cependant, pour combattre le déficit cholinergique, seule la voie de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'AChE a conduit à la mise sur le marché de plusieurs médicaments pour le traitement léger à modéré de la pathologie. Ces approches thérapeutiques seront discutées en détails dans la partie III.1.1 de ce chapitre.

#### *II.4.2.2 La Butyrylcholinestérase*

La BuChE humaine (hBuChE) a une structure très voisine de l'AChE humaine, avec un CAS et un PAS relié par une gorge hydrophobe. Néanmoins, le CAS de la BuChE est plus grand que celui de l'AChE, dû au remplacement de deux phénylalanines par une valine et une leucine, deux résidus plus petits.<sup>56</sup> Elle peut donc accueillir en son sein des substrats plus gros que l'acétylcholine comme la butyrylcholine. Au niveau biochimique, quelques études ont indiquées que certains neurones cholinergiques utilisent la BuChE plutôt que l'AChE pour cliver l'ACh. Ainsi, 10 à 15 % des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et l'amygdale, expriment la BuChE au lieu de l'AChE. D'ordinaire, chez un sujet sain, la BuChE est 4 fois moins présente dans le cerveau que l'AChE (ratio 4:1, AChE:BuChE), cependant avec la progression de la maladie et la perte des neurones cholinergiques, l'activité de l'AChE chute de 45% tandis que celle de la BuChE augmente deux fois plus, ce qui influence considérablement le ratio initial.<sup>57,58</sup>

#### *II.4.3 Aux origines du déficit cholinergique*

L'hypothèse cholinergique fut introduite il y a plus de 20 ans pour expliquer les pertes de mémoire et de cognition.<sup>59</sup> Elle suggère qu'un déficit en acétylcholine dans le système nerveux central contribue aux défaillances cognitives et mnésiques. Cela se traduit au niveau biochimique, par des perturbations de la synthèse de l'ACh et de l'homéostasie du calcium ainsi que par l'altération des récepteurs cholinergiques (nAChR et mAChR).

L'origine du déficit cholinergique reste très débattue dans la communauté scientifique. Cependant, un coupable semble tout désigné : il s'agit du peptide A $\beta$ . En effet, la présence de plaques amyloïdes neurotoxiques est connue pour influencer négativement les sites de recapture de la choline, perturbant, de fait, son recyclage et inhibant la libération de l'ACh dans la fente synaptique.<sup>60-62</sup> Les dégénérescences neurofibrillaires détériorent également les fonctions cholinergiques.<sup>63</sup> Certaines études émettent l'hypothèse que l'activation agoniste des récepteurs cholinergiques et en particulier ceux de type muscariniques peut jouer un rôle dans la protéolyse de l'APP et diminuer la synthèse du peptide A $\beta$  en favorisant la voie non amyloïdogénique, c'est-à-dire le clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase.<sup>64,65</sup>

Enfin, d'autres études ont démontré l'implication des cholinestérases (AChE et BuChE) dans le processus d'agrégation du peptide A $\beta$ . Ces derniers promeuvent le processus de fibrillogénèse.<sup>66-70</sup> Plus particulièrement, une étude d'Inestrosa *et al.* a mis en évidence le rôle déterminant du PAS de l'AChE dans l'accélération de l'agrégation du peptide A $\beta$ .<sup>71</sup> Ainsi, l'inhibition simultanée du CAS et du PAS des cholinestérases peut à la fois améliorer la neurotransmission cholinergique et ralentir l'agrégation du peptide A $\beta$ .

#### II.4.4 La neurotransmission glutamatergique

Un autre neurotransmetteur joue un rôle non négligeable dans la maladie d'Alzheimer. Il s'agit du L-glutamate. Les neurones glutamatergiques sont impliqués dans les processus de cognition et de mémoire.<sup>72</sup> Les dépôts amyloïdes, les dégénérescences neurofibrillaires, le stress oxydant ou encore le dérèglement mitochondrial conduisent à l'accumulation du L-glutamate dans les synapses. Or, une forte concentration en glutamate induit un effet neurotoxique, appelé excitotoxicité. Cela se traduit par l'activation excessive des récepteurs qui lui sont associés, en particulier, les récepteurs du N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA).<sup>73</sup> Ceux-ci deviennent très perméables et permettent l'influx massif de Ca<sup>2+</sup>, amplifiant ainsi la vulnérabilité du neurone vis-à-vis du processus de neurodégénération (cf. Chap. I, II.6).<sup>74</sup> Cette découverte a permis de développer la classe des antagonistes des récepteurs NMDA utilisé pour le traitement de la pathologie (cf. Chap. I, III.1.2).

## II.5 Le stress oxydant

Le stress oxydant tient un rôle capital dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer.<sup>75</sup> Bien qu'il constitue seulement 2% de la masse corporelle, le cerveau humain consomme environ 20% de l'oxygène apporté par le système respiratoire.<sup>76</sup> Cela le rend plus vulnérable, que d'autres organes, au stress oxydant. Ainsi, l'oxydation des principaux constituants des neurones (lipides, protéines et acides nucléiques) est une des spécificités de la maladie d'Alzheimer.<sup>77</sup> En d'autres mots, l'accumulation constante des espèces réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species*, ROS) et azotées (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) entraîne inévitablement des dommages importants aux neurones.<sup>78</sup> Ce stress oxydant est causé par différents facteurs sous-jacents tel que le dysfonctionnement mitochondrial,<sup>79,80</sup> la perturbation de l'homéostasie de certains métaux (Cu, Fe, Zn) et leurs fonctions dans l'agrégation du peptide A $\beta$ ,<sup>81,82</sup> ou encore la neuroinflammation.<sup>83,84</sup> Il y a consensus sur le fait que ces mécanismes étiologiques coexistent tous en même temps, s'influençant mutuellement à de multiples niveaux.<sup>85</sup>

### II.5.1 Le dysfonctionnement mitochondrial

La mitochondrie est le moteur cellulaire. Elle est cruciale pour la survie neuronale.<sup>86,87</sup> Siège de la chaîne de transport des électrons où est synthétisée l'adénosine triphosphate (ATP), impliquée dans le métabolisme énergétique, elle est à la fois source d'espèces réactives oxygénées (ROS) et sujette elle-même au stress oxydant.<sup>88,89</sup> Plusieurs observations suggèrent que le dysfonctionnement mitochondrial joue un rôle important dans l'apparition de la pathologie et dans sa progression. Des preuves de ce dysfonctionnement ont été rapportées par des études cytologiques de neurones de malades d'Alzheimer où l'on a constaté un dérèglement manifeste la chaîne respiratoire mitochondriale.<sup>90</sup>

Cependant, une question reste en suspens. Qu'est-ce qui provoque ce dysfonctionnement ? Encore une fois, le principal coupable reste le peptide A $\beta$ . En effet, il entrave la chaîne respiratoire de la mitochondrie en réduisant l'activité d'enzymes clés (Cytochrome Oxydase, Alpha-Cétoglutarate Déshydrogénase, Pyruvate Déshydrogénase) impliquées dans le cycle de Krebs et corrompt l'intégralité de la machinerie

mitochondriale.<sup>91,92</sup> A $\beta$  se lie également à l'enzyme ABAD (*A $\beta$ -Binding Alcohol Dehydrogenase*), un membre de la famille des déshydrogénases réductases dans la mitochondrie, pour induire l'apoptose et la production de ROS dans les neurones.<sup>93</sup>

## II.5.2 Rôle des métaux dans le stress oxydant

Le dérèglement de l'homéostasie des métaux constitue l'un des piliers permettant d'expliquer le stress oxydant.<sup>94</sup> Des métaux comme le cuivre, le fer ou bien le zinc se retrouvent normalement en grande quantité dans le cerveau. Cela s'explique par la présence de nombreuses métalloprotéines et processus métaboliques qui utilisent ces métaux, notamment, dans les neurones.<sup>95</sup> Cependant, chez certains patients atteints de la démence d'Alzheimer, de fortes concentrations en Cu, Fe et Zn ont été décelées en comparaison avec des sujets sains (Cu : 390  $\mu$ M vs. 70  $\mu$ M, Zn : 1055  $\mu$ M vs. 350  $\mu$ M, Fe : 940  $\mu$ M vs. 340  $\mu$ M).<sup>96</sup> Cette dérégulation est une caractéristique claire de la maladie d'Alzheimer.

Les couples d'oxydo-réduction Cu<sup>+</sup>/Cu<sup>2+</sup> et Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> facilitent l'activation de l'oxygène moléculaire utilisé par différentes enzymes de la chaîne respiratoire mitochondrial.<sup>97</sup> Cependant, des interactions non régulées du cuivre et du fer avec l'oxygène facilitent également la génération de ROS. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la mitochondrie est un milieu hautement oxygéné qui produit entre autre, du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>, principales espèces initiatrices du stress oxydant.<sup>98,99</sup>

## II.5.3 Interactions des métaux avec le peptide $\beta$ -amyloïde

Des preuves expérimentales ont montré l'implication des ions métalliques dans l'agrégation du peptide A $\beta$  et sa précipitation sous forme de plaques amyloïdes. En effet, de nombreuses études ont notamment montré que les cinétiques d'agrégation sont accélérées en présence de Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup>.<sup>100-102</sup> Ces découvertes corrélerent avec les fortes concentrations en métaux retrouvées dans les plaques amyloïdes.<sup>103</sup>

En plus de l'aspect cinétique, le peptide A $\beta$  est également capable de réduire les ions Cu<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup> en ions Cu<sup>+</sup> et Fe<sup>2+</sup>. En présence de ces ions réduits, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> génère alors des radicaux

hydroxyles (OH<sup>•</sup>), via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, provoquant ainsi une cascade d'évènements délétères menant à la neurodégénération (Schéma I.7).<sup>104</sup>

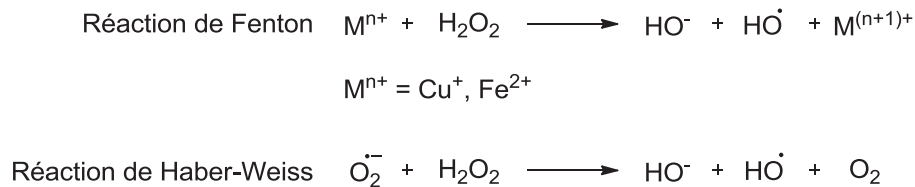


Schéma I.7. Réactions de Fenton et Haber-Weiss.

## II.6 Dishoméostasie du calcium

L'ion Ca<sup>2+</sup> est d'une importance cruciale pour la survie neuronale. Dans cette partie, nous éclaircirons le rôle du calcium dans la maladie d'Alzheimer en nous focalisant plus particulièrement sur le lien existant entre le peptide Aβ et la concentration en ions Ca<sup>2+</sup> intracellulaires ainsi que ses effets sur les récepteurs glutamatergiques. Depuis que Khachaturian *et al.* ont découvert l'implication de la dishoméostasie du calcium dans la maladie d'Alzheimer,<sup>105</sup> d'autres études ont largement corroboré cette hypothèse.<sup>106,107</sup> Sous des conditions basales, l'ion Ca<sup>2+</sup> est maintenu à de faibles concentrations (de l'ordre du nM) par différents type de canaux calciques (voltage- et ligand- dépendants) et de mécanismes de transport.<sup>108</sup> Cependant, le peptide Aβ est capable d'affecter la perméabilité des canaux calciques qui se retrouvent de fait dans l'incapacité de réguler les concentrations internes en ions, et plus particulièrement en ions Ca<sup>2+</sup>.<sup>109,110</sup>

Le peptide Aβ provoque également l'augmentation de l'influx en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui se produit quand le neurotransmetteur glutamate suractive les récepteurs NMDA.<sup>111</sup> Cette découverte est corroborée par le fait que la mémantine<sup>112</sup> (un antagoniste des récepteurs NMDA approuvé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, cf. III.1.2) bloque aussi l'influx en Ca<sup>2+</sup> induit par Aβ, indiquant ainsi que les molécules capables de restaurer l'homéostasie en ions Ca<sup>2+</sup> dans les neurones constituent une stratégie thérapeutique viable.

### III. Approches thérapeutiques

Nous avons exploré au fil des parties précédentes, la vaste et complexe étiologie de la maladie d'Alzheimer. Les différentes facettes de cette pathogénie permettent de définir plusieurs approches thérapeutiques. Le schéma I.8 récapitule ces différentes cibles thérapeutiques.

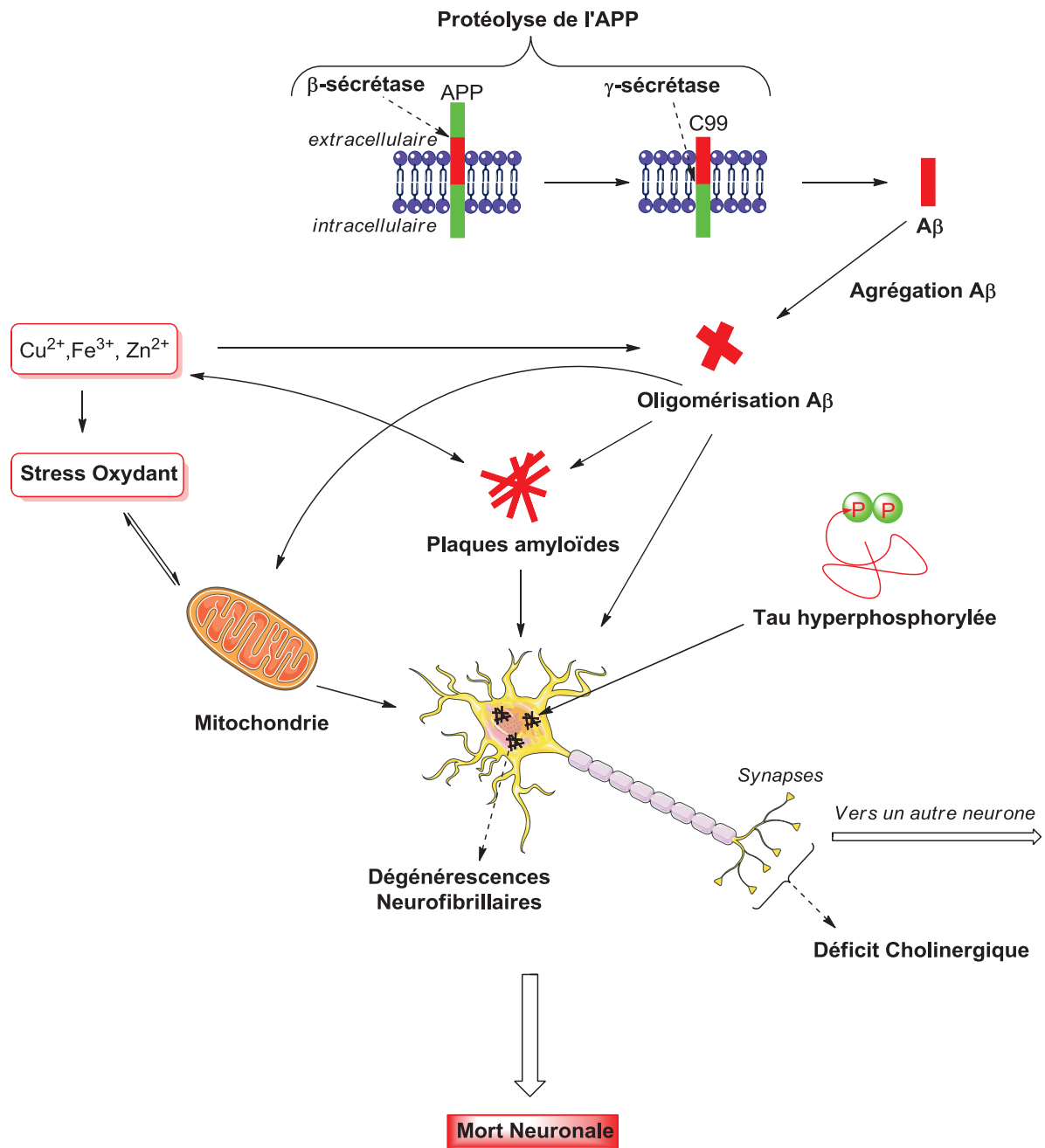


Schéma I.8. Voies étiologiques reconnues dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer.



En résumé, les principales cibles thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer sont les suivantes :

- **La voie amyloïdogénique** : protéolyse de l'APP par les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases, peptide  $A\beta$  et son agrégation.
- **Dégénérescences neurofibrillaires** : hyperphosphorylation de la protéine tau et son agrégation.
- **Stress oxydant** : radicaux libres, interactions ions métalliques-peptide  $A\beta$ , dysfonctionnement mitochondrial, monoamine oxydases (MAO) A et B.
- **Déficit cholinergique** : cholinestérases (AChE/BuChE), récepteurs cholinergiques (nAChR, mAChR).
- **Dishoméostasie du calcium** : canaux du calcium voltage- et ligand- dépendants.
- **Autres récepteurs** : récepteurs glutamatergiques (NMDA), sérotoninergiques (5-HT), etc...

Aucun traitement n'est actuellement disponible pour guérir la maladie d'Alzheimer. Les thérapies utilisées de nos jours se concentrent surtout sur les symptômes et ne permettent malheureusement pas de combattre les déficiences cognitives et mnésiques sur le long terme.

Au cours des prochaines parties, nous verrons tout d'abord quels sont les traitements médicamenteux actuellement disponibles sur le marché puis nous nous intéresserons aux approches mono- et multi-cibles qui visent les différentes causes étiologiques que l'on vient de mentionner.

### III.1 Thérapies actuellement disponibles

#### III.1.1 Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Le déficit cholinergique constitue actuellement une des axes principaux pour développer de nouveaux outils thérapeutiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, l'approche retenue fut celle de l'inhibition de l'acétylcholinestérase, permettant d'augmenter la concentration en ACh, responsable de l'influx nerveux dans la fente synaptique.

Quatre inhibiteurs d'acétylcholinestérase ont été développés et mis sur le marché pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit de la tacrine (Cognex®), du donépézil (Aricept®), de la galanthamine (Reminyl®) et de la rivastigmine (Exelon®)(Figure I.6).

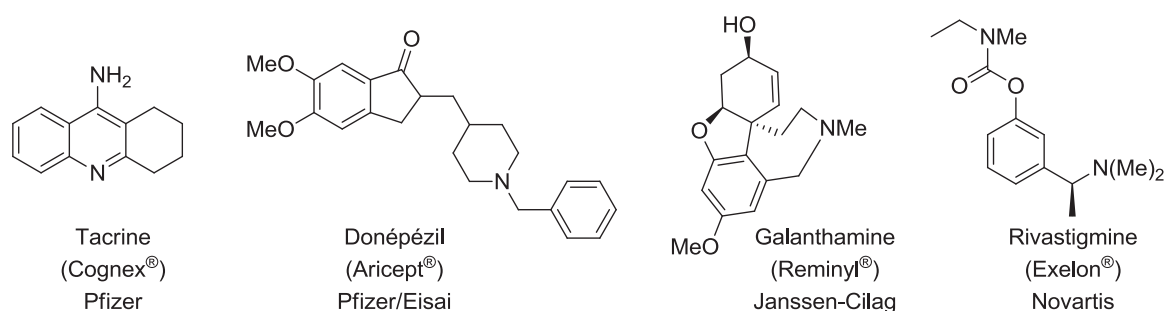


Figure I.6. Inhibiteurs de l'AChE.

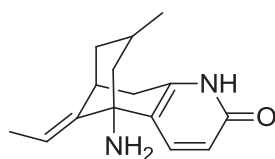
La tacrine (Cognex®) fut commercialisée par Parke-Davis (Pfizer maintenant) sous forme de chlorure de 1,2,3,4-tétrahydro-9-acridinammonium monohydraté. C'est un inhibiteur non compétitif de l'AChE mais aussi de la BuChE. La tacrine se fixe au niveau du site catalytique (CAS) de l'AChE de manière réversible.<sup>113</sup> Celle-ci fut le premier traitement approuvé par les autorités de santé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. La tacrine a été commercialisée en France sous la marque Cognex®, mais fut retirée du marché français en 2004 à cause notamment de son hépatotoxicité aigüe.<sup>114</sup>

Le donépézil (Aricept®) ou 2-((1-benzylpipéridin-4-yl)méthyl)-5,6-diméthoxy-2,3-dihydro-1H-indèn-1-one, commercialisé sous forme de chlorhydrate par Pfizer et Eisai, appartient à la famille des *N*-Benzylpipéridines. C'est un inhibiteur sélectif, non-compétitif et réversible de l'AChE.<sup>115</sup> Il constitue un des traitements anti-Alzheimer les plus courants utilisés de nos jours.

La galanthamine (Reminyl®) ou (4*aS*,6*R*,8*aS*)-2-méthoxy-11-méthyl-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4*aH*-benzo[2,3]benzofuro[4,3-*cd*]azépin-6-ol, est un alcaloïde d'origine naturelle isolé de plusieurs plantes de la famille des Amaryllidacées comme le perce-neige ou le narcisse. Elle est commercialisée sous forme de bromhydrate par Janssen-Cilag. La galanthamine potentialise l'action de l'ACh en inhibant de façon compétitive et réversible l'AChE. On suppose qu'elle pourrait restaurer les transmissions cholinergiques. Son effet indésirable le plus fréquent est son action émétique.<sup>116</sup>

Enfin, la rivastigmine (Exelon®) ou (S)-3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl éthyl(méthyl)carbamate est un carbamate de la famille des stigmines. Elle est commercialisée sous forme d'hydrogénotartrate par Novartis. Comme la tacrine, elle agit comme inhibiteur pseudo-irréversible et non compétitif des cholinestérases (AChE/BuChE). Sa faible toxicité rend cette molécule très attractive pharmacologiquement.<sup>117</sup>

Il existe un autre inhibiteur de l'AChE qui n'est pas actuellement sur le marché, il s'agit de l'Huperzine A ou (5*R*,9*S*,*E*)-5-amino-11-éthylidène-7-méthyl-5,6,7,8,9,10-hexahydro-5,9-methanocycloocta[*b*]pyridin-2(1*H*)-one (Figure I.7). Cet alcaloïde est extrait de *Huperzia serrata*, une plante herbacée de la famille des lycopodes. L'extrait de cette plante est utilisé depuis des siècles dans médecine traditionnelle chinoise pour traiter diverses neuropathologies comme la schizophrénie. L'huperzine se fixe de manière réversible et non compétitive aux cholinestérases et améliore les fonctions cognitives et mnésiques.<sup>118</sup>

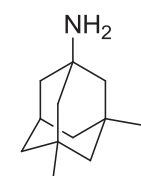


Huperzine A

Figure I.7. Structure de l'Huperzine A, inhibiteur de l'AChE.

### III.1.2 Antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA

La mémantine (Ebixa®) ou (1*r*,3*R*,5*S*,7*r*)-3,5-diméthyladamantan-1-amine est un antagoniste non compétitif des récepteurs glutamatergiques NMDA (Figure I.8). Ces récepteurs régulent le développement synaptique et sont impliqués dans les processus de mémorisation et d'apprentissage.<sup>119</sup> Comme nous l'avons évoqué plus tôt dans ce manuscrit (cf. II.6), la mémantine, par son action antagoniste sur le glutamate, bloque l'entrée massive d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le peptide A $\beta$  ce qui retarde le processus de neurodégénérescence. Elle est indiquée dans les formes modérés à sévères de la maladie d'Alzheimer.



Mémantine  
(Ebixa®)  
Lundbeck

Figure I.8. Structure de la mémantine, antagoniste des récepteurs NMDA.

## III.2 Approches mono-cible

Nous allons nous intéresser dans cette partie à différentes familles de molécules, synthétiques ou naturelles, qui visent une seule cible ou phénomène biologique dans la maladie d'Alzheimer. L'accent sera notamment mis sur quelques exemples de molécules engagées, ou qui ont été engagées, dans des essais cliniques.

### III.2.1 Antioxydants purs

Les molécules possédant des propriétés antioxydantes vont pouvoir lutter contre le stress oxydant. Des études ont montré que le régime « méditerranéen », composé principalement de légumes, noix, fromages, céréales complètes, huile d'olive et vin rouge, pouvait réduire les risques de contracter des maladies neurodégénératives ou des maladies cardiovasculaires.<sup>120,121</sup> Plus particulièrement, des études ont démontré que les polyphénols, antioxydants reconnus et présents dans le vin rouge, pouvaient protéger contre la maladie d'Alzheimer.<sup>122,123</sup>

Au cours des prochaines sections, nous présenterons quelques exemples de molécules antioxydantes ayant différents modes d'actions.

### III.2.2 Antioxydants directs

Ces molécules vont être actives sur les radicaux libres déjà formés. Elles exercent leur pouvoir antioxydant en captant les radicaux libres. Parmi les plus connus, on peut citer le resvératrol, la curcumine, les acides férulique/lipoïque ou bien encore, la mélatonine (Figure I.9).

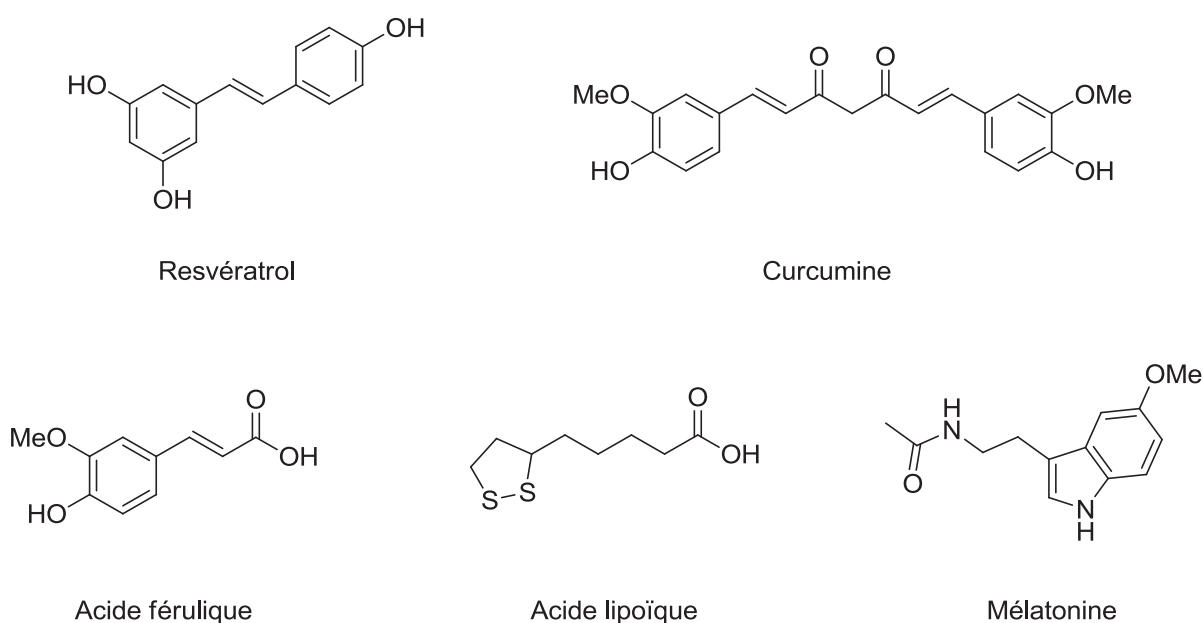


Figure I.9. Structures d'antioxydants directs.

Le resvératrol ou *trans*-3,4',5'-trihydroxystilbène est un polyphénol de la famille des stilbènes. On le retrouve notamment dans les tanins issus du vin rouge. Les propriétés antioxydantes du resvératrol sont dues à la présence de ses groupements hydroxyles aromatiques qui captent et stabilisent par mésomérie les radicaux libres. De plus, il présente également des propriétés neuroprotectrices *in vivo*.<sup>124</sup>

La curcumine ou 1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione est le pigment jaune du curcuma. Ce composé est également capable de capter, *via* son groupement hydroxyle, des radicaux libres et les stabiliser par mésomérie. Des études *in vivo*

ont aussi montré que la curcumine protège les neurones contre la toxicité induite par le peptide A $\beta$  et inhibe son agrégation.<sup>125,126</sup>

L'acide férulique ou acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)prop-2-énoïque est présent dans les céréales, plus particulièrement dans l'écorce de blé et de riz. Il peut piéger des radicaux libres grâce à ses groupements hydroxyle et carboxylique. Son effet antioxydant est reconnu dans la communauté scientifique.<sup>127</sup>

L'acide lipoïque ou acide 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoïque possède trois rôles. Il agit à la fois, sous sa forme réduite di-thiol, comme cofacteur pour des enzymes mitochondriales bioénergétiques (pyruvate déhydrogénase et l' $\alpha$ -cétoglutarate déhydrogénase), il est antioxydant grâce à la présence du groupement disulfure et a la capacité de complexer certains métaux.<sup>128</sup>

La mélatonine, *N*-[2-(5-méthoxy-1*H*-indol-3-yl)éthyl]éthanamide, *N*-acétyl-5-méthoxytryptamine, appelé aussi « hormone du sommeil », est sécrétée par la glande pinéale la nuit et permet de réguler le rythme circadien. En plus de sa fonction hormonale, elle est aussi un puissant antioxydant avec des propriétés neuroprotectrices.<sup>129,130</sup>

Ces différentes structures antioxydantes, que l'on vient de voir, ont inspiré beaucoup de chimistes médicaux pour la synthèse organique d'analogues qui, soit permettent une meilleure vectorisation biologique,<sup>85</sup> soit apportent d'autres propriétés pharmacologiques (cf. Chap. I, III.3).

### III.2.3 Antioxydants ciblant la mitochondrie

Nous l'avons vu précédemment (cf. Chap. I, II.5.1), la mitochondrie est un haut lieu du stress oxydant dans la cellule nerveuse et son rôle est central dans la maladie d'Alzheimer. Cela a poussé certains chercheurs à cibler spécifiquement cet organite en développant des antioxydants conçus pour l'atteindre exclusivement.<sup>131</sup> Ainsi, en profitant du potentiel élevé de la membrane mitochondriale interne (180 mV), des chercheurs ont eu l'idée de se servir d'un composé cationique lipophile comme d'un véhicule pour cibler spécifiquement la

mitochondrie.<sup>132</sup> En effet, des composés comme le triphénylphosphonium, exploitent les forces électrostatiques rencontrées au niveau des membranes et s'accumulent très bien dans la mitochondrie. Ce principe de véhicule a donc été utilisé pour l'absorption d'une variété d'antioxydants comme, par exemple, les composés MitoQ<sub>10</sub> et MitoE<sub>2</sub> (Schéma I.9).

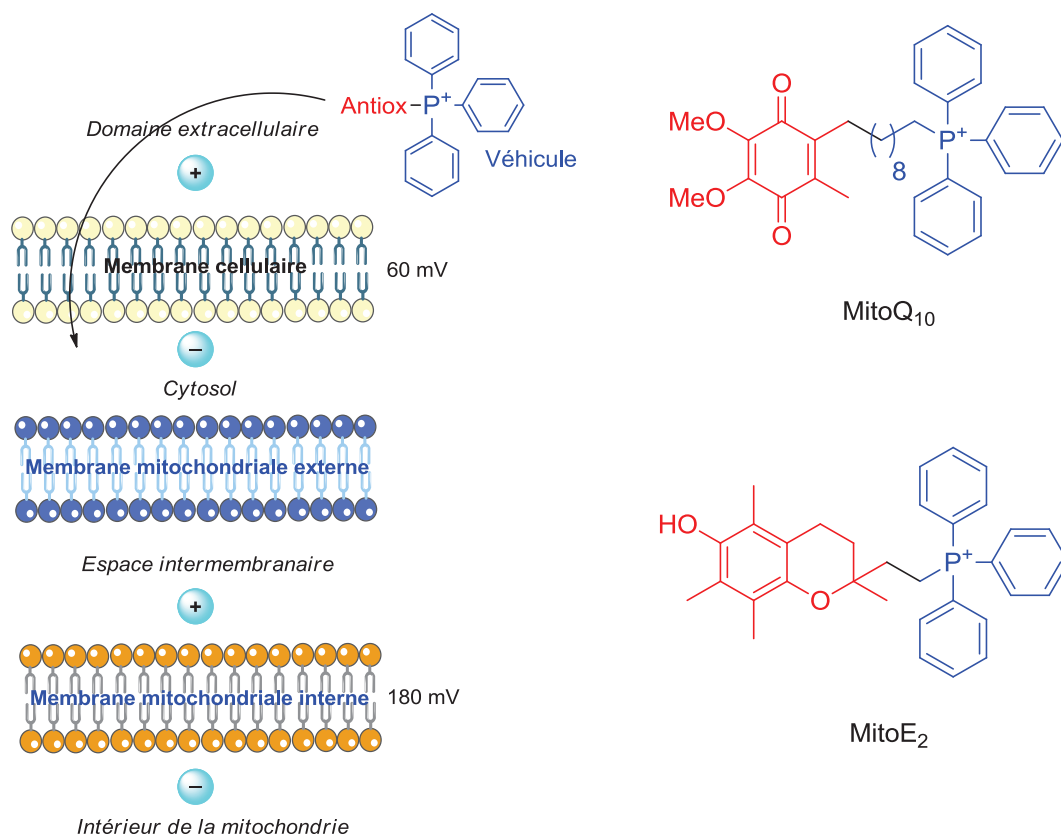


Schéma I.9. Coupe des différentes membranes et ciblage par des antioxydants véhiculés.

### III.2.4 Activateurs des défenses endogènes antioxydantes

En temps normal, divers mécanismes antioxydants endogènes rentrent en action pour réguler la production d'oxydants. La voie de signalisation Keap1-Nrf2-ARE constitue l'un de ces plus importants systèmes.<sup>133</sup> Celle-ci est basée sur l'activation de Nrf2 (*Nuclear E2-related factor*). Nrf2 est une protéine très importante dans l'organisation des défenses antioxydantes. Elle déclenche l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes comme la HO-1, la glutathione S-transférase et la NAD(P)H :quinone oxidoréductase 1 (NQO1). Dans les conditions normales, Nrf2 est inhibé par une autre protéine, Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*). Succinctement, quand un stress oxydant se produit, Keap1 est modifié

à des résidus cystéines clés et libère Nrf2 qui se dimérise avec des facteurs de transcription (famille des sMaf) dans le noyau cellulaire et se lie au promoteur ARE (*Antioxydant Response Element*), stimulant ainsi la transcription de gènes cytoprotecteurs (Schéma I.10).<sup>134</sup>

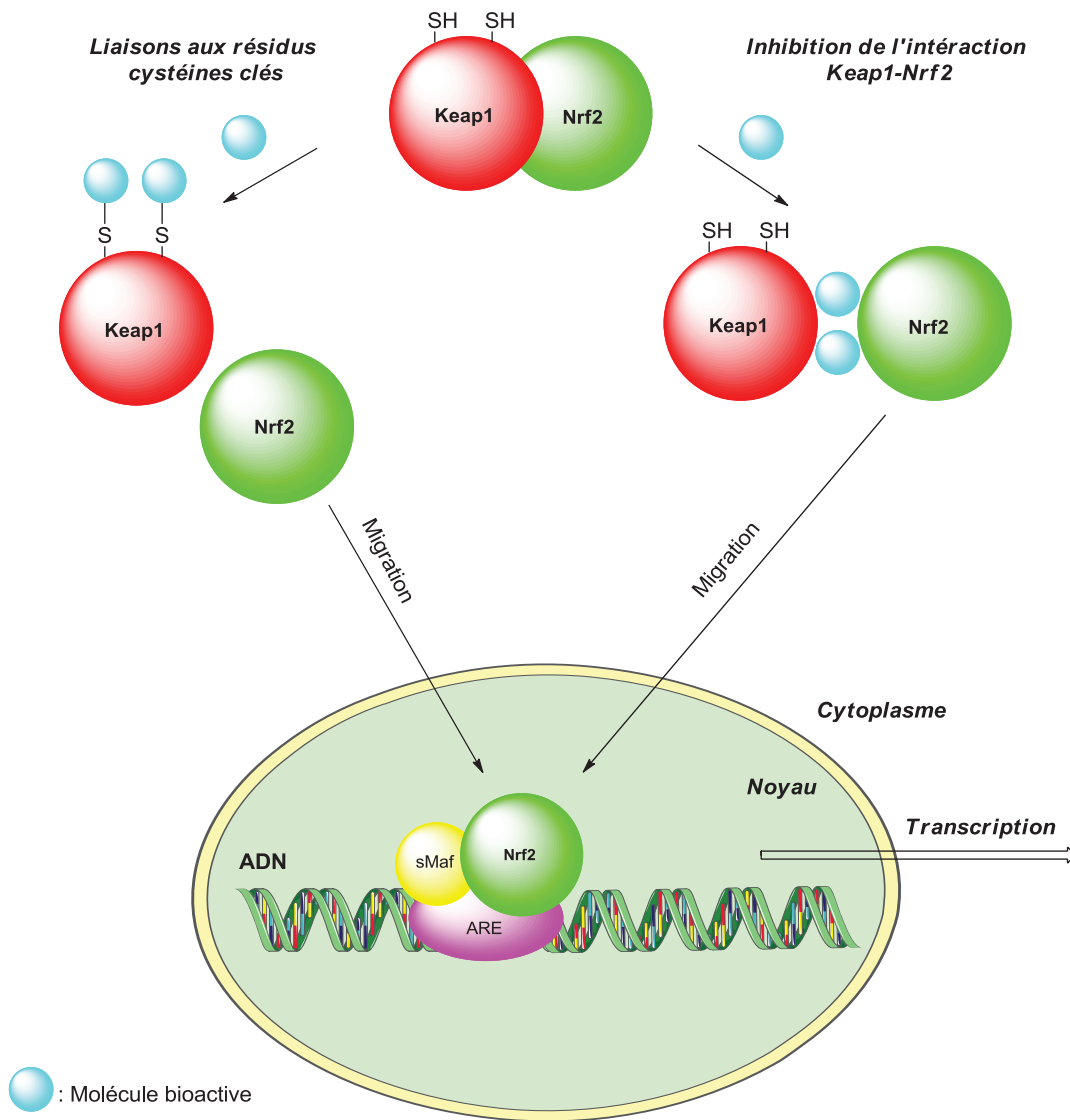


Schéma I.10. Mécanismes possibles de l'activation de Nrf2 par une molécule bioactive.<sup>85</sup>

L'activation exogène de Nrf2 peut se faire soit par liaisons covalentes aux résidus cystéines de Keap1, soit en inhibant l'interaction protéine-protéine entre Keap1 et Nrf2. La plupart des activateurs de Nrf2 sont des électrophiles (accepteurs de Michael, époxydes, etc.).<sup>135</sup> Cela n'est pas étonnant lorsque l'on sait que Keap1 est riche en résidus cystéine comportant des groupements thiols nucléophiles. Depuis quelques années, plusieurs



activateurs Nrf2 ont été développés et certains d'entre eux sont en phase d'étude clinique.<sup>136</sup> Parmi ces activateurs, on peut citer le fumarate de diméthyle ou bien encore le CDDO-Me (*triterpenoid bardoxolone methyl ester*) (Figure I.10).

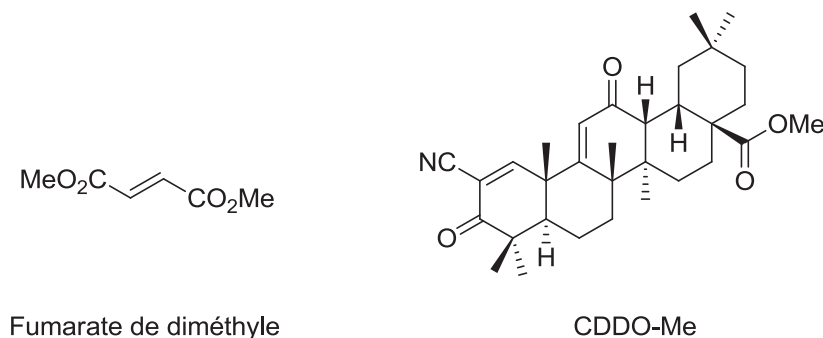


Figure I.10. Exemples d'activateurs électrophiles de Nrf2.

Ainsi, d'un point de vue mécanistique, l'activation de Nrf2 constitue une piste thérapeutique très intéressante pour induire une réponse antioxydante endogène, pas seulement pour la maladie d'Alzheimer mais également pour d'autres neuropathologies comme la maladie de Parkinson<sup>137</sup> ou la sclérose latérale amyotrophique.<sup>138</sup>

### III.2.5 Chélateurs de métaux

Une autre solution pour prévenir le stress oxydant est de complexer les ions métalliques ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ...) qui interagissent avec le peptide A $\beta$ . Ils agissent ainsi comme antioxydants indirects. A titre d'exemple, nous présentons ici 3 agents chélateurs bien documentés : le plérixafor, le clioquinol et le PBT2 (Figure I.11).

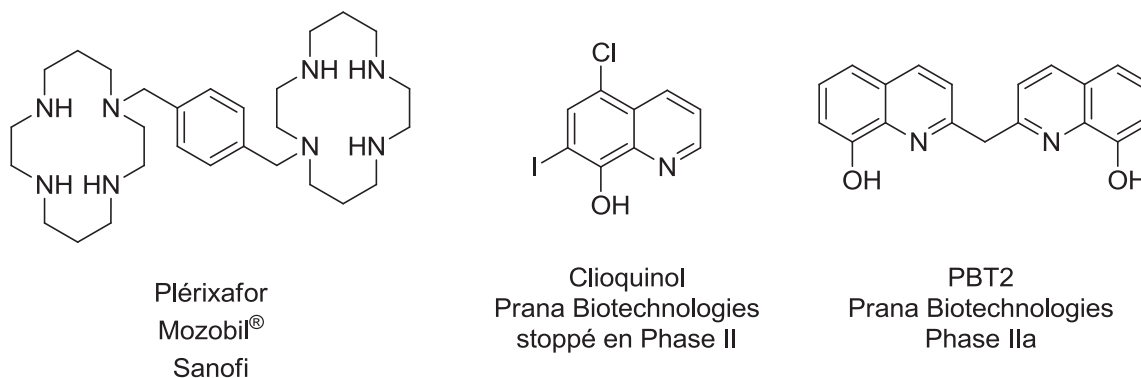


Figure I.11. Structure de chélateurs de métaux testés dans la maladie d'Alzheimer.

Le plérixafor ou 1,4-bis[(1,4,8,11-tétraazacyclotétradécan-1-yl)méthyl]benzène est un bicyclame chélateur du cuivre commercialisé par Sanofi. Il réduit la concentration en ions  $\text{Cu}^{2+}$  dans le cortex cérébral et il est capable de maintenir une concentration normale en cuivre dans le sang et le LCR chez le rat.<sup>139</sup> Par ailleurs, il a déjà une application anticancéreuse. Vendu sous la marque Mozobil® par Sanofi, il agit comme antagoniste des récepteurs CXCR4 et il est indiqué pour la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans le cadre d'une autogreffe pour le traitement de myélome ou de lymphome.

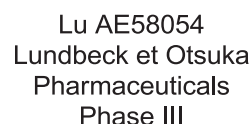
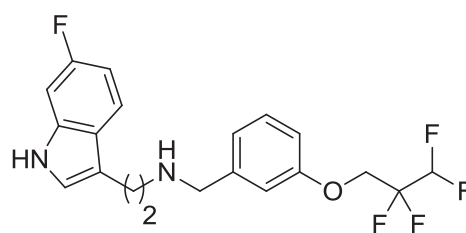
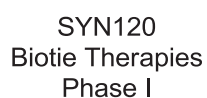
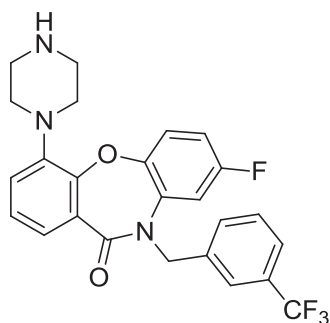
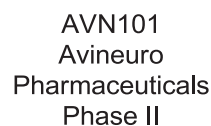
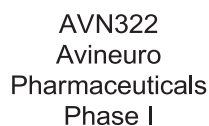
Le clioquinol ou 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline est un chélateur lipophile de métaux. Capable de traverser la BHE, il dissout les plaques amyloïdes en complexant les ions métalliques ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) présents dans la structure même du peptide  $\text{A}\beta$ .<sup>140</sup> Il fut utilisé autrefois comme agent antiparasitaire jusqu'à qu'il soit retiré du marché en 1970 après que l'on ait découvert qu'il était neurotoxique et était à l'origine d'une épidémie de myélo-neuropathie optique au Japon.<sup>141</sup> Les chercheurs ont émis l'hypothèse que le clioquinol diminue la biodisponibilité de la vitamine B12 ce qui mène à une dégénérescence progressive du réseau nerveux et en particulier, du nerf optique. Toutefois, sous des conditions où l'on contrôle le taux de vitamines, cette neuropathie peut être évitée. Des études cliniques de phase II ont démontré son rôle bénéfique chez les malades d'Alzheimer. Dans ces études, le clioquinol a réduit de manière notable le déclin cognitif.<sup>142</sup> Cependant, son développement fut stoppé en faveur de son successeur, le PBT2, qui présente beaucoup moins d'effets secondaires graves.

Le PBT2 ou 2,2'-méthylènebis(8-hydroxyquinoline) est un analogue dimérisé du clioquinol mais sans atome d'iode ou de chlore. C'est un chélateur de métaux qui est actuellement en phase IIa d'étude clinique.<sup>143</sup> Le PBT2 empêche l'oligomérisation du peptide  $\text{A}\beta$ , dissout les oligomères déjà existants et améliore globalement les fonctions cognitives chez la souris.<sup>144</sup> Prana biotechnologies développe actuellement cette molécule.

### III.2.6 Antagonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>6</sub>

Les récepteurs sérotoninergiques sont une classe de récepteurs couplés aux protéines G (Les protéines G permettent le transfert d'information à l'intérieur de la cellule) qui sont également impliqué dans le processus de cognition et de mémorisation. Leur modulation stimule des réponses intracellulaires, *via* l'activation des protéines G (transduction du signal), libérant le neurotransmetteur sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) qui peut ensuite influencer les processus mnésique et cognitif. Il existe 7 sous-types de récepteurs sérotoninergiques, 5-HT<sub>1-7</sub>.

Des études précliniques et cliniques ont dévoilé le rôle de certains sous-types (notamment les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>4</sub> et 5-HT<sub>6</sub>) dans différents aspects du dysfonctionnement cognitif. Plus particulièrement, les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ont intéressé beaucoup de chercheurs comme cible thérapeutique pour le développement d'«agents nootropes». D'autres recherches ont montré que les antagonistes de récepteurs 5-HT<sub>6</sub> permettent de moduler les systèmes cholinergique, glutamatergique et GABAergique ce qui se traduit par une amélioration globale des capacités cognitives. La figure I.12 montre quelques exemples de molécules antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> engagées actuellement dans différentes phases d'études cliniques.<sup>145</sup>



### III.2.7 Inhibiteurs de la $\beta$ -sécrétase

Les inhibiteurs de BACE-1 peuvent être subdivisés en deux catégories. Il y a les inhibiteurs peptidomimétiques et non peptidomimétiques. Ici, nous présentons 3 exemples d'inhibiteurs BACE-1 issus soit du monde académique, soit de l'industrie pharmaceutique : GRL-8234, LY2886721 et AZD3839 (Figure I.13).

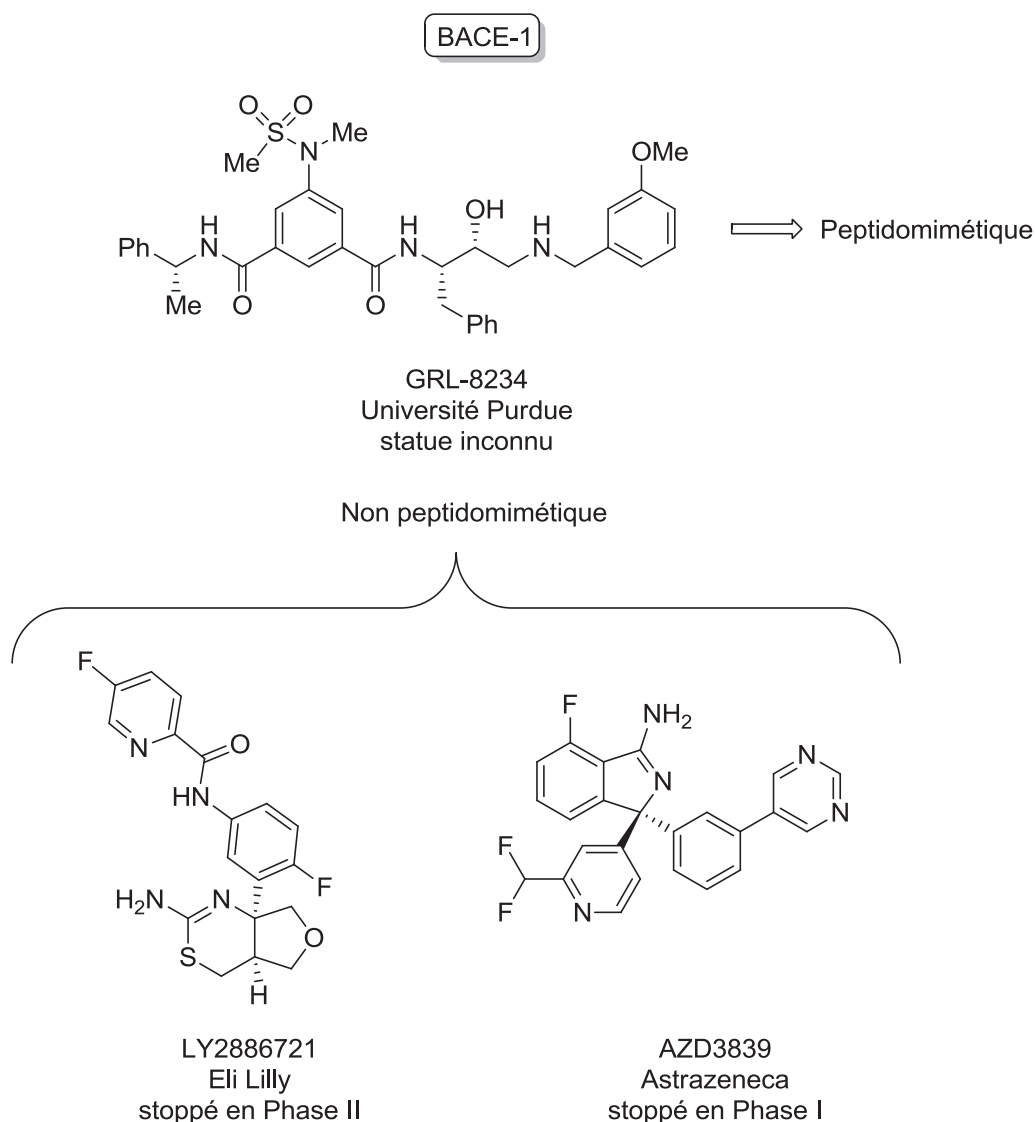


Figure I.13. Exemples d'inhibiteurs BACE-1 ayant fait l'objet d'études cliniques.

GRL-8234 est un composé développé par le groupe de Arun K. Ghosh à l'Université Purdue aux Etats-Unis. C'est un peptidomimétique, capable de traverser la BHE, qui a montré son efficacité *in vivo* en diminuant significativement la production de peptide A $\beta$  et en améliorant les capacités cognitives.<sup>147</sup> Son statut clinique nous est inconnu pour le moment.

Quant aux composés LY2886721 et AZD3839, ils n'ont pas eu la chance de continuer l'aventure des essais cliniques car ils ont présenté des effets secondaires

rédhibitoires.<sup>148,149</sup> Ces molécules servent néanmoins de prototypes pour la découverte d'autres inhibiteurs BACE-1 ayant une pharmacologie plus sûre.

Parmi les inhibiteurs BACE-1 encore actifs en essais cliniques, nous pouvons citer les composés suivants (structures non dévoilées publiquement): HPP854 (High Point Pharmaceuticals), MK-8931 (Merck), E2609 (Eisai) et AZD3293 (Astrazeneca).<sup>150</sup>

### III.2.8 Modulateurs de la $\gamma$ -sécrétase

La  $\gamma$ -sécrétase est un complexe enzymatique intramembranaire composé de 4 protéines distincts : Aph-1 (*anterior pharynx-defective 1*), Pen-2 (*Presenilin enhancer protein 2*), Présénilines (PS1 ou PS2) et la nicastrine (Nct).<sup>151</sup> En plus de l'APP, la  $\gamma$ -sécrétase est connu pour avoir beaucoup de substrat (plus de 50). Cela inclut les protéines Notch, Jagged et Nectin-1 $\alpha$ .<sup>152</sup> Comme elle libère le peptide A $\beta$  de la membrane en clivant le fragment C99, son inhibition a donc constitué une piste sérieuse pour beaucoup de chimistes médicaux.

La figure I.14 montre 4 molécules qui agissent sur l'activité enzymatique de la  $\gamma$ -sécrétase : Le semagacestat, le begacestat, SCH 900229 et le D-pinitol (NICS-15). La plupart de ces composés ont présenté des profils pharmacologiques et pharmacocinétiques intéressants (diminution de la production de peptide A $\beta$ , bonne biodisponibilité orale et une pénétration de la BHE optimale). Cependant le développement du Semagacestat (développé par Eli Lilly) fut arrêté récemment car les résultats des essais cliniques de phase III chez l'homme ont montré un déclin cognitif et une grande difficulté dans l'exécution des tâches quotidiennes en comparaison avec le placebo.<sup>153</sup> De plus, cet inhibiteur de première génération, a été associé à un risque accru de cancer de la peau, qui peut être relié à une perturbation de la voie de signalisation Notch.<sup>154</sup>

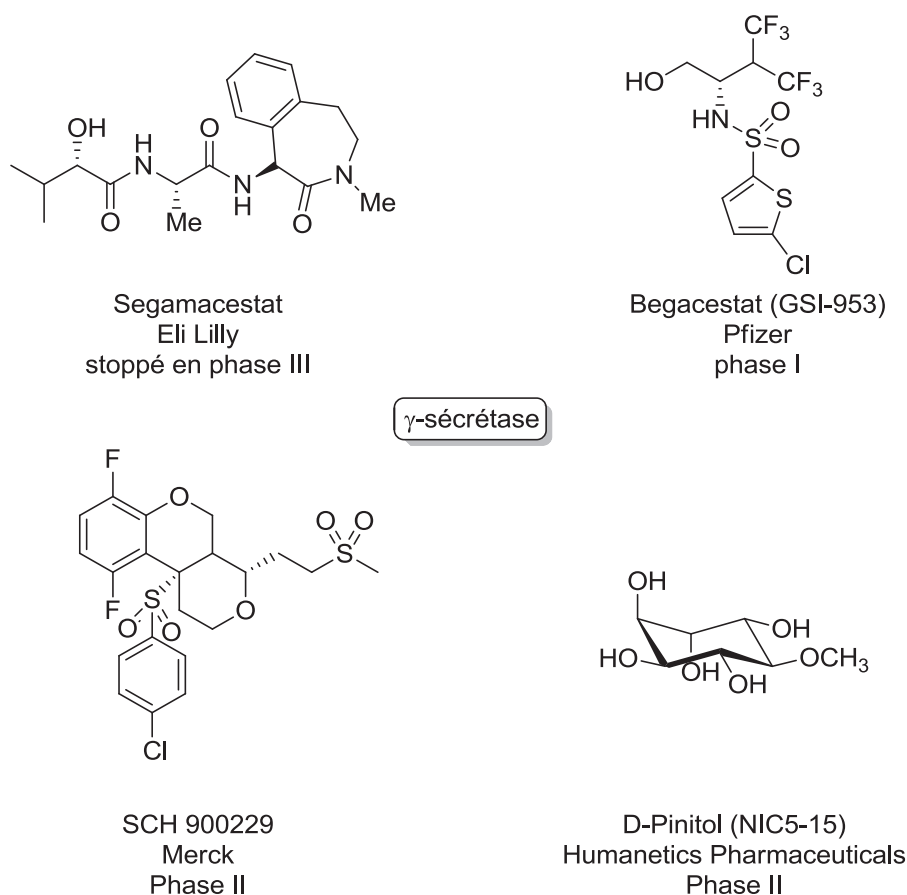


Figure I.14. Exemples de modulateurs  $\gamma$ -sécrétase ayant fait ou faisant l'objet d'études cliniques.

Pour épargner Notch, impliquée dans le développement cellulaire et la différenciation, une nouvelle génération de molécules fut développée. On ne parle plus alors d'inhibiteurs mais de modulateurs de la  $\gamma$ -sécrétase. Le Begacestat,<sup>155</sup> SCH 900229 (Merck)<sup>156</sup> et le D-pinitol (Humanetics Pharmaceuticals)<sup>157</sup> font partie de cette nouvelle génération. Ils sont actuellement évalués chez le petit animal et chez l'homme.

### III.2.9 Immunothérapie A $\beta$

Plusieurs types d'immunothérapies A $\beta$  sont en cours d'étude dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Il y a l'immunisation directe avec le peptide A $\beta$  synthétique, ou des fragments de A $\beta$  reliés à des protéines vectrices et l'administration passive d'anticorps monoclonaux directement dirigé contre le peptide A $\beta$ .<sup>158</sup>

Différents anticorps monoclonaux ont été développés pour induire une réponse immunitaire contre le peptide A $\beta$ . On peut citer par exemple le Bapineuzumab ou le Solanezumab. Cependant, de récentes études cliniques de phase III ont montré que ces anticorps n'ont pas réussi à améliorer les fonctions cognitives chez les patients traités.<sup>159</sup>

Malgré ces derniers échecs, d'autres vaccins anti-A $\beta$  de seconde génération sont actuellement testés chez l'homme. On peut citer, par exemple, CAD106, ACC-001, Affitope AD02, le Gantenerumab ou encore le Crenezumab.<sup>160</sup>

### III.3 Approche multi-cibles

Nous avons vu dans les sections précédentes, certains exemples de molécules bioactives ciblant exclusivement un seul processus biologique dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Cette approche « une cible-un composé » est la norme actuellement dans l'industrie pharmaceutique. Cependant, ce type de stratégie a prouvé en partie son inefficacité au vu des nombreuses molécules dont le développement clinique a été stoppé récemment comme le composé LY288721 (inhibiteur  $\beta$ -sécrétase) ou le segamacestat (inhibiteur  $\gamma$ -sécrétase). Une alternative à ce raisonnement mono-cible est de réellement prendre en compte le caractère multifactoriel de la maladie d'Alzheimer en développant des molécules capables d'interagir simultanément avec plusieurs cibles d'intérêt, c'est ce que Cavalli *et al.* ont défini comme des composés « multi-cibles » ou *Multitarget-Directed Ligands*, MTDLs en anglais.<sup>161</sup> On parle alors d'approche « multi-cibles ».<sup>162-164</sup>

Nous serions néanmoins tentés d'explorer la voie de la médication multiple (cocktail de pilules ou une pilule contenant plusieurs principes actifs, comme cela est le cas pour le traitement du SIDA, du cancer) qui semble à première vue une alternative viable. Cependant, cette approche multi-médicamenteuse présente plusieurs inconvénients comme le manque d'observance de la part des patients et les possibles interactions entre principes actifs menant à différents effets secondaires. De plus, le développement chimique et clinique d'une molécule multi-cibles est, en principe, comparable à n'importe quel autre molécule mono-cible.



Néanmoins, le principal défaut de l'approche multi-cibles est le manque de sélectivité conduisant à d'éventuelles interactions avec des cibles non impliquées et qui seraient à l'origine d'effets secondaires. (Schéma I.11).

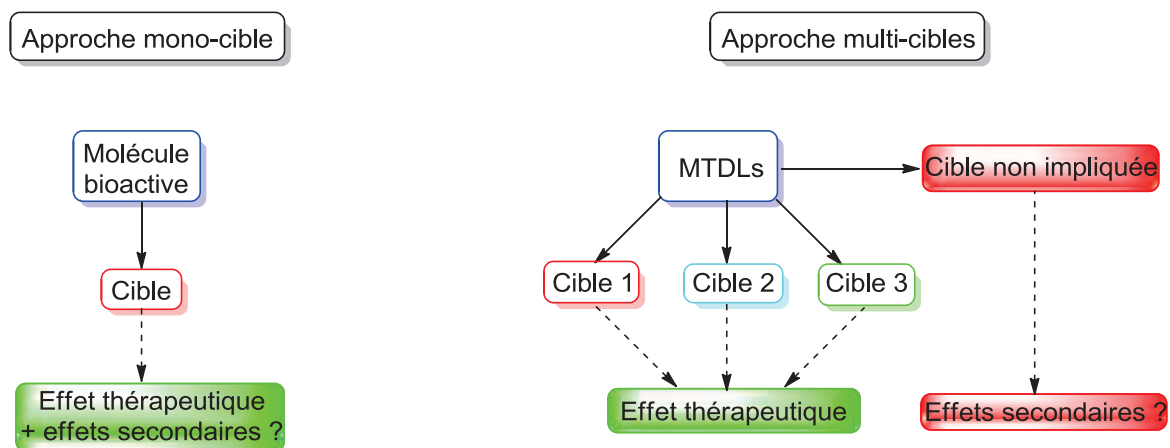


Schéma I.11. Approches mono-cible et multi-cibles.<sup>161</sup>

Nous verrons dans les prochaines parties, quelques exemples de molécules décrites dans la littérature combinant plusieurs propriétés pharmacologiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

### III.3.1 Inhibiteurs multicibles acétylcholinestérase/monoamine-oxydases

Les monoamine-oxydases (MAO) A et B sont les enzymes qui catalysent la déamination oxydante des amines biogéniques, impliquées dans la neurotransmission nerveuse (dopamine, sérotonine, histamine, adrénaline, noradrénaline). Cette déamination produit, entre autre, du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dans la maladie d'Alzheimer mais aussi de Parkinson, les neurones utilisant ces neurotransmetteurs tendent à diminuer et provoquent des déficits cognitifs et des symptômes dépressifs. Ainsi, l'inhibition simultanée des MAO et des cholinestérases pourrait stimuler la neurotransmission et réduire le stress oxydant induit par les ROS. Plusieurs exemples existent dans la littérature,<sup>165,166</sup> cependant, la meilleure illustration de ce concept de double inhibition AChE/MAO est le Ladostigil.<sup>167</sup> Ce composé est synthétisé en mélangeant le fragment carbamate de la rivastigmine (inhibiteur de l'AChE) avec la structure aminopropargylindane de la rasagiline (inhibiteur sélectif de la MAO-B). Le

ladostigil présente en plus de l'inhibition de la MAO-B et de l'AChE, un bon profil neuroprotecteur. Il est actuellement en phase IIb d'études cliniques (Figure I.15).<sup>168</sup>

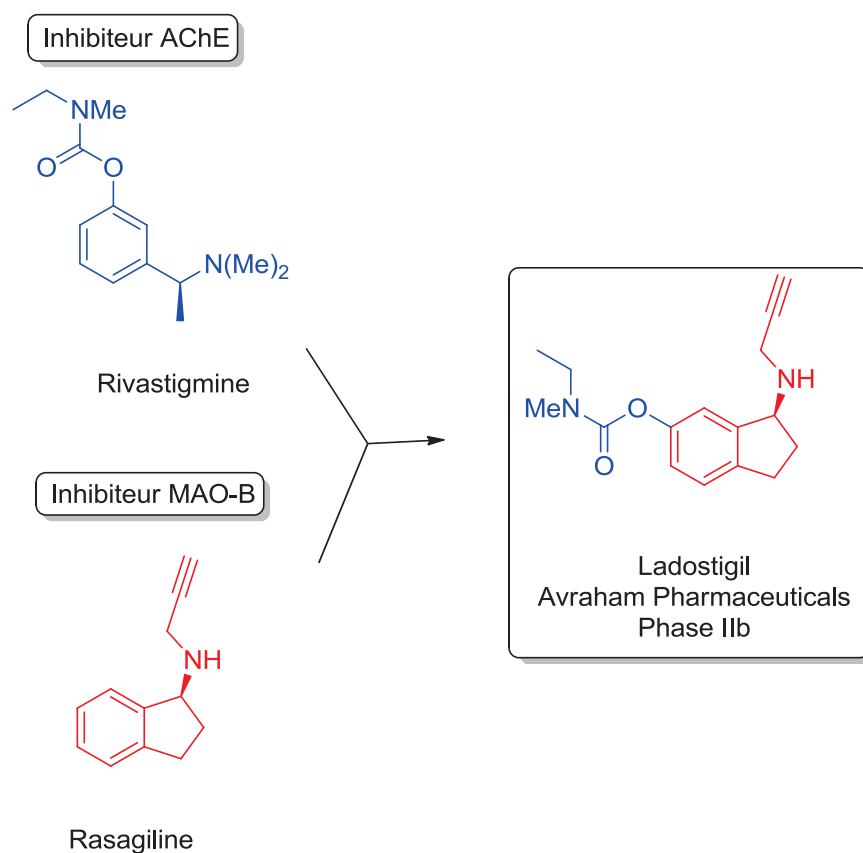


Figure I.15. Structure du Ladostigil résultant de la fusion des structures de la rivastigmine et de la rasagiline.

### III.3.2 Hybrides et analogues de la tacrine

La bis(7)-tacrine fut un des premiers homodimère à être renseigné dans la littérature avec une activité inhibitrice de l'AChE mille fois supérieur à celle de la tacrine et une forte sélectivité vis-à-vis de la BuChE.<sup>169</sup> Ce composé a servi de modèle pour la conception d'une grande variété d'hybrides de la tacrine. La principale caractéristique de ces hybrides est la présence d'une chaîne hydrocarbonée, appelé « *linker* », qui relie les pharmacophores entre eux. Dans le cas de la bis(7)-tacrine, une tacrine va se lier au PAS de l'AChE, l'autre tacrine, au CAS. On obtient alors un hybride qui se lie aux deux sites d'interactions de l'AChE (*Dual binding site inhibitor* en anglais). De plus, sa liaison au PAS de l'AChE peut conduire à l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ. La variation de la taille du linker permet de moduler l'activité enzymatique de l'AChE. Ce principe a été appliqué pour la conception

d'autres hybrides de la tacrine possédant différents types de pharmacophores (Figure I.16).

170

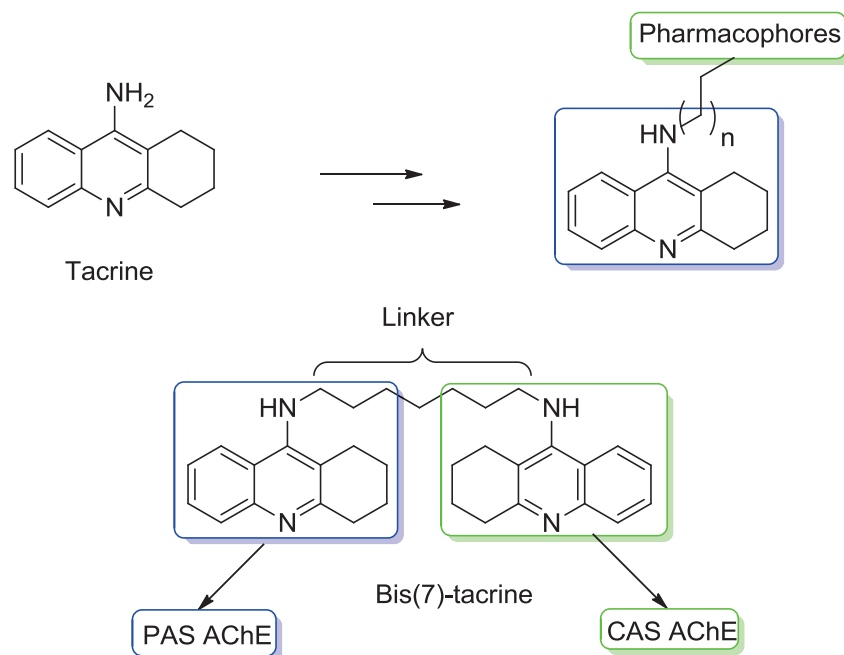


Figure I.16. Concept multi-cibles appliqué à la tacrine et structure de la bis(7)tacrine.

La lipocrine (Figure I.17) combine les propriétés antioxydantes de l'acide lipoïque et l'activité inhibitrice d'une 6-chlorotacrine. Ces deux pharmacophores sont reliés entre eux par un linker  $n = 3$ . En se liant au CAS et au PAS de l'AChE, elle a la capacité de réduire l'agrégation induite par A $\beta$ . De plus, ce composé a montré un bon profil neuroprotecteur contre le stress oxydant en comparaison avec l'acide lipoïque.<sup>171</sup>

L'hybride tacrine-acide férulique présenté dans la figure I.17 est le chef de file d'une série d'hybrides de la tacrine et de l'acide férulique, antioxydant phénolique naturel.<sup>172,173</sup> Ce composé réduit la toxicité induite par A $\beta$ <sub>1-42</sub> dans le cerveau de rat. De plus, il est capable d'inhiber le CAS et le PAS des cholinestérases et possède une bonne activité antioxydante.

Une variété d'hybrides combinant les structures de la tacrine et de la mélatonine ont été décrites dans la littérature dont un exemple est présenté dans la figure I.17. Ce composé possède l'activité antioxydante de la mélatonine, présente une forte inhibition des cholinestérases et des effets neuroprotecteurs contre la toxicité induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la

rotenone et le peptide A $\beta$ <sub>25-35</sub> sur les cellules nerveuses SH-SY5Y. Cet hybride a également montré un fort pouvoir d'inhibition de l'auto-agrégation et de l'agrégation assistée par AChE du peptide A $\beta$ . Enfin, il est capable de traverser la BHE efficacement.<sup>174</sup>

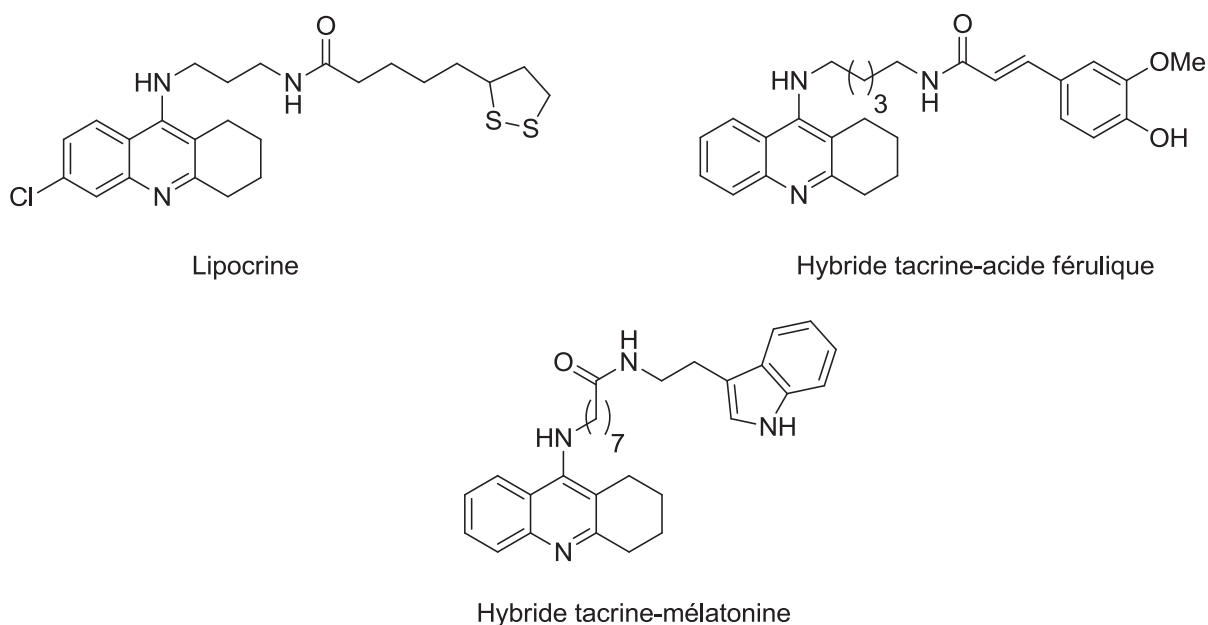


Figure I.17. Exemples d'hybrides de la tacrine.

Enfin, il est important de signaler un dérivé de la tacrine particulièrement intéressant : la 7-MEOTA ou 9-amino-7-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydroacridine (Figure I.18).<sup>175</sup> Ce composé s'est révélé être beaucoup moins hépatotoxique en comparaison avec la tacrine tout en conservant une bonne inhibition des cholinestérases. Ainsi, Korabecny *et al.* ont voulu améliorer le profil pharmacologique de la 7-MEOTA en synthétisant différents analogues *N*-alkyl-7-MEOTA. Ces derniers composés se sont révélés être bien plus actifs que la 7-MEOTA seule sur les cholinestérases humaines tout en conservant une faible toxicité en comparaison avec la tacrine.<sup>176</sup>



Figure I.18. Structures d'analogues de la tacrine.

Une autre façon originale de créer des hybrides est de fusionner deux structures en une. La fusion de la nimodipine, un antagoniste des canaux calciques voltage-dépendants et de la tacrine pour former des « tacripyrines » illustre bien ce concept (Figure I.19). Ces molécules se sont révélés être des inhibiteurs très sélectifs de l'AChE ainsi que des antagonistes des canaux du calcium voltage-dépendants. Ils ont également montré un bon profil neuroprotecteur sur la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y.<sup>177</sup>

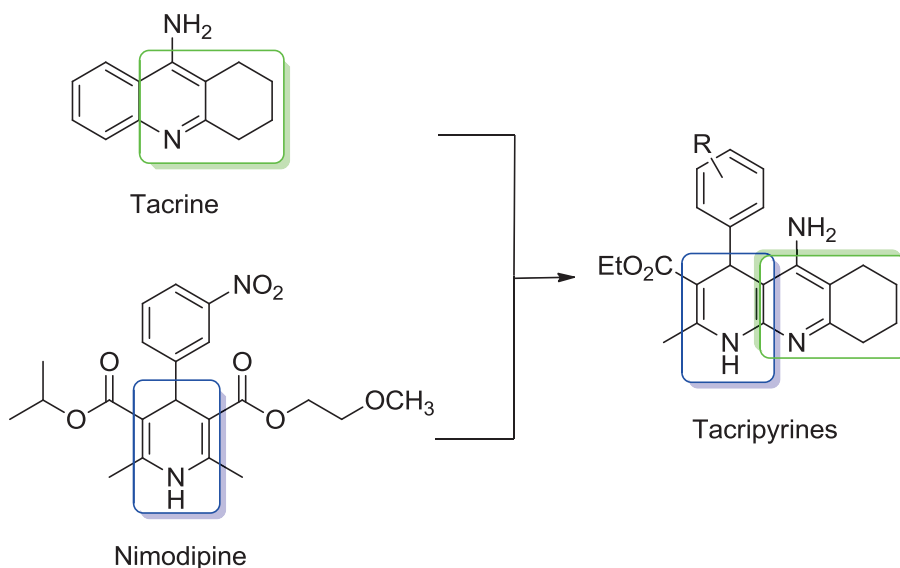


Figure I.19. Tacripyrines résultant de la fusion des structures de la tacrine et de la nimodipine.

### III.3.3 Hybrides du donépézil

Le donépézil a stimulé la créativité de beaucoup de chimistes médicaux qui se sont penché sur la synthèse d'analogues et hybrides pouvant apporter d'autres propriétés pharmacologiques en plus de l'inhibition des cholinestérases. D'un point de vue structural, Le donépézil possède deux parties : une partie indanone et une partie *N*-benzylpipéridine. Ces parties ont servi de structures primaires sur lesquelles ont été greffés différents pharmacophores.<sup>178</sup> Quelques exemples sont donnés dans la figure I.20.

Les hybrides donépézil-2-quinolone sont une série de dérivés synthétisés dans notre laboratoire. En termes d'inhibition des cholinestérases, l'exemple présenté dans le figure I.20 s'est révélé être très sélectif pour l'AChE et a montré de bonnes propriétés antioxydantes.<sup>179</sup>

Les hybrides donépézil-ebbselen combinent quant à eux, la structure originale de l'ebbselen avec une partie *N*-benzylpipéridine. L'ebbselen, qui contient un atome de sélénium dans sa structure, est un mime de la glutathione peroxydase (GPx), une enzyme agissant comme antioxydant endogène. Ces composés, qui traversent la BHE, peuvent donc à la fois agir sur les cholinestérases et comme antioxydant. De plus, des tests toxicologiques *in vivo* sur la souris ont démontré l'innocuité de ces hybrides. Une structure est présentée dans la figure I.20 à titre d'exemple.<sup>180</sup>

Pour clore cette série d'exemples dédiée aux hybrides du donépézil, nous présentons le composé ASS234. Cet hybride a montré des propriétés anticholinestérasiques grâce la présence de la partie *N*-benzylpipéridine ainsi qu'une forte inhibition des MAO-A et B due à la présence du fragment propargylamine.<sup>181,182</sup> De plus, ce composé est capable d'inhiber l'apoptose induite par le peptide A $\beta$  ainsi que son agrégation.<sup>183</sup>

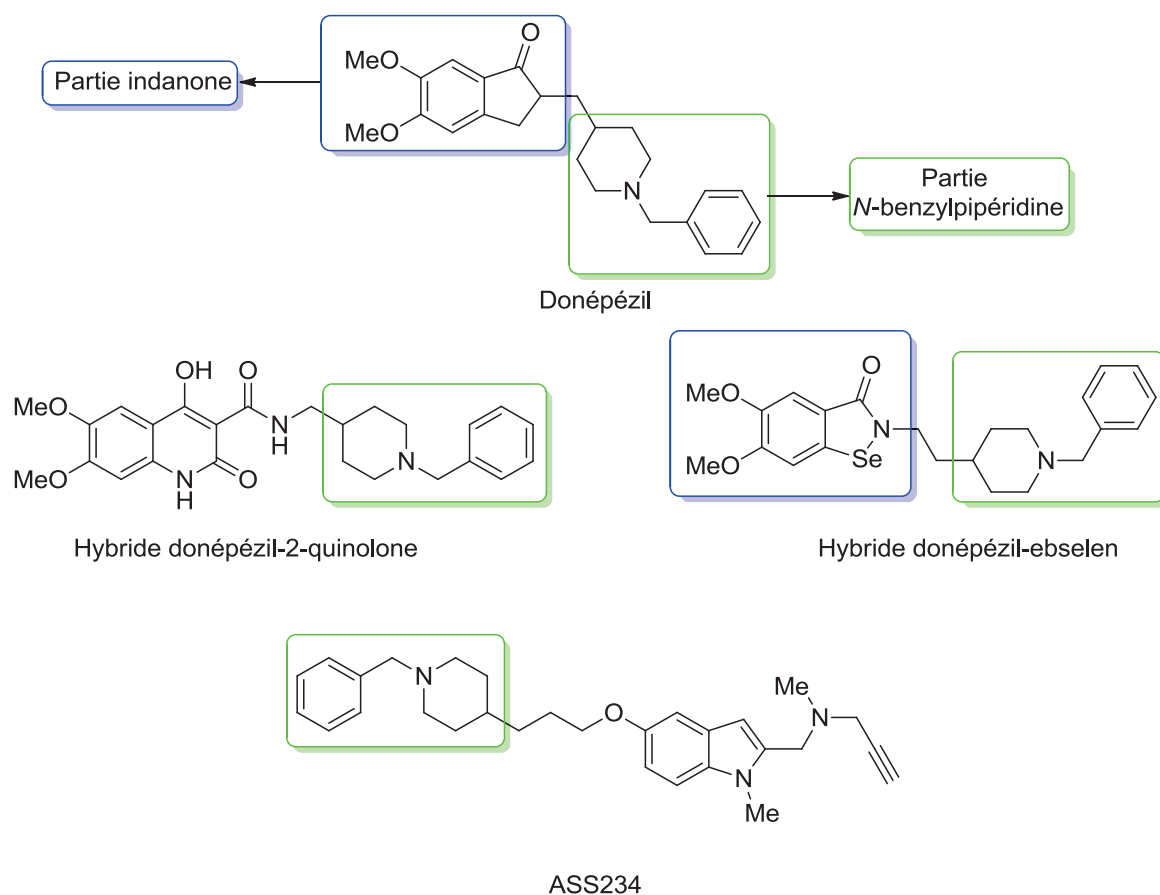


Figure I.20. Exemples d'hybrides du donépézil.

### III.3.4 Poly-amines

Les poly-amines désignent une série de composés synthétisés, entre autres, par l'équipe de Melchiorre à l'Université de Bologne et qui s'inscrivent parfaitement dans l'approche multi-cibles.<sup>184,185</sup> A titre d'exemple, deux poly-amines d'un grand intérêt sont rapportés ici: la caproctamine et la memoquin.

La caproctamine est un inhibiteur de l'AChE. Il est capable de se lier à la fois au CAS et au PAS de celle-ci, permettant d'inhiber potentiellement l'agrégation du peptide A $\beta$  induite par l'AChE. De plus, ce composé est un antagoniste des récepteurs muscariniques de type 2 (m2AChR). L'antagonisme de ce récepteur permet de faciliter la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique.<sup>185</sup>

La memoquin combine les effets pharmacologiques de la caproctamine à des propriétés antioxydantes et anti- $\beta$ -sécrétase. L'introduction d'une quinone dans la structure est intéressante à plusieurs égards. Tout d'abord, la présence d'une quinone crée un système  $\pi$  plan et hydrophobe, qui est en principe capable de se lier au peptide A $\beta$  et perturber les interactions protéine-protéine dans le processus de fibrillogénèse. Ensuite, cette quinone sert de substrat à l'enzyme NAD(P)H/quinone oxydoréductase 1 (NQO1) qui la réduit en hydroquinone. C'est cette dernière forme qui est responsable de l'activité antioxydante (Figure I.21).<sup>186,187</sup>

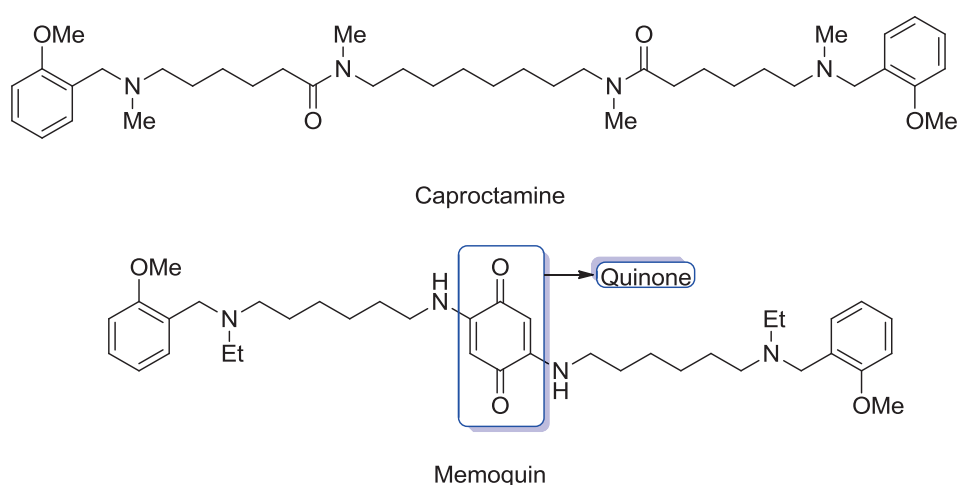


Figure I.21. Structures de la caproctamine et de la memoquin.

### III.3.5 Chélateurs de métaux multi-cibles biodisponibles

Ces molécules sont basées sur l'approche dite « pro-drogue » ou plus précisément, « pro-chélatants » multi-cibles. Ces espèces ne devenant actives et chélatrices que sous l'action d'un phénomène de clivage chimique ou biochimique.<sup>188,189</sup>

Le composé pro-chélatant présenté dans la figure I.22 possède des motifs appartenant à la rivastigmine (inhibiteur AChE) et au composé HLA20 (chélateur de métaux). Sous l'action enzymatique de l'AChE, la fonction carbamate est clivée. Cela libère le groupement hydroxyle qui peut alors jouer le rôle de ligand avec l'atome adjacent d'azote de la quinoline et ainsi complexer des ions métalliques comme  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$  (Figure I.22).<sup>190</sup>

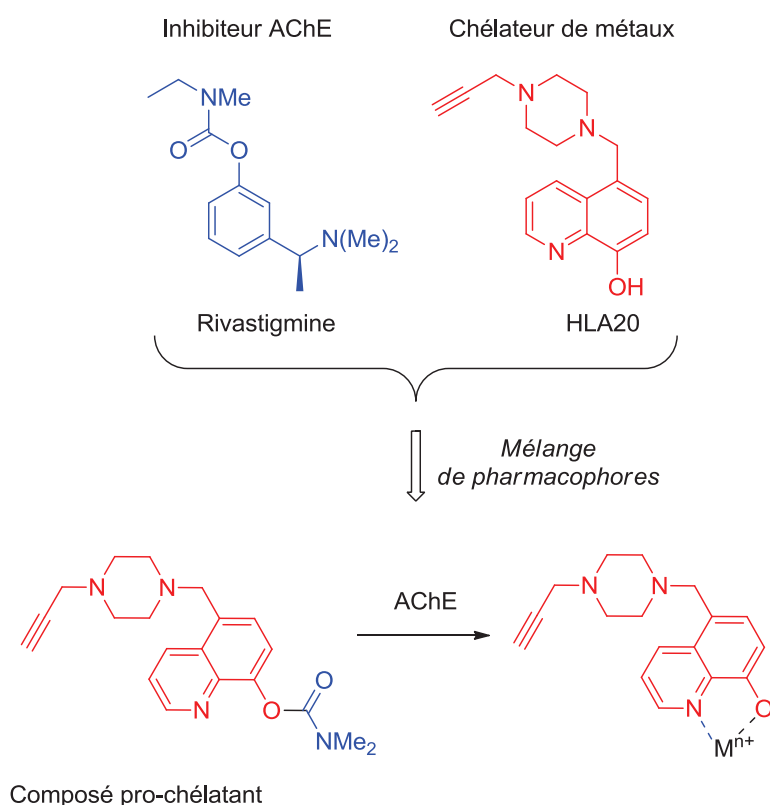


Figure I.22. Chélateur de métaux bio-disponibles.



#### IV. Conclusion sur le chapitre I

Tout au long de ce premier chapitre, nous avons discuté de la physiopathologie complexe de la maladie d'Alzheimer en mettant en avant les interconnexions existantes entre plusieurs causes étiologiques notamment entre la voie amyloïdogénique, les dégénérescences neurofibrillaires, le stress oxydant ou bien encore, le déficit cholinergique.

Par la suite, nous avons vu que les médicaments actuellement sur le marché, basés principalement sur les inhibiteurs d'acétylcholinestérase, ne permettaient qu'un traitement symptomatique de la maladie. A travers des exemples de molécules tel que le semagacestat (inhibiteur  $\gamma$ -sécrétase), nous avons également mis en lumière les limites de l'approche mono-cible qui ne considère pas réellement le caractère multifactoriel de la maladie d'Alzheimer.

Nous avons évoqué ensuite l'approche multi-cibles en donnant quelques exemples de composés, tel que les hybrides de la tacrine ou du donépézil, pouvant interagir et moduler l'activité d'une grande variété de cibles d'intérêt. Cette dernière approche nous a servi de base de travail pour la conception de nos propres composés multi-cibles *via* les réactions multicomposants de Ugi et de Passerini. Ainsi, nous allons discuter au chapitre suivant des différentes options synthétiques qu'offrent les réactions multicomposants ainsi que de leur utilité en Chimie Médicinale.

## CHAPITRE II

### Chimie et biologie des réactions multicomposants



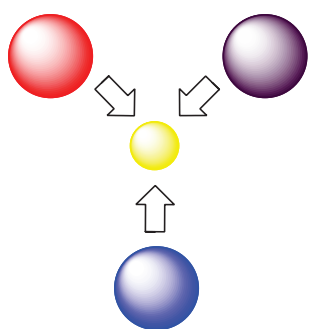
## I. Les réactions multicomposants : « couteau suisse » du chimiste médicinal

### I.1 Principe des réactions multicomposants

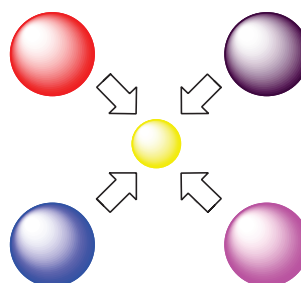
En Chimie Médicinale, il est crucial d'obtenir la molécule désirée à partir de précurseurs facilement accessibles et bon marché, en un minimum d'étapes et de temps et sous des conditions éco-compatibles. Ce sont des principes intuitifs rigoureusement appliqués, de l'échelle du laboratoire académique à l'industrie pharmaceutique.

Pour respecter ce cahier des charges, il faut des procédés robustes. La procédure de synthèse la plus triviale est celle de la synthèse linéaire. Elle permet d'enchaîner séquentiellement les étapes. Cependant, l'isolement d'intermédiaires et leurs purifications peuvent avoir un impact sur la consommation globale en solvants et sur le temps de production. Cela est d'autant plus décisif pour l'industrie pharmaceutique où la réduction des coûts de production est une règle d'or.

En réponse à ce mode de synthèse, les réactions multicomposants (RMC ou *multicomponent reactions*, *MCR* en anglais) constitue une véritable alternative, notamment en Chimie Combinatoire pour la conception de bibliothèques de molécules. Dans ces réactions, 3 composants ou plus, réagissent pour former un seul produit contenant la majorité des atomes des précurseurs de synthèse.<sup>191</sup> Elles permettent la préparation en une étape de molécules possédant une riche diversité structurale et potentiellement bioactives (Schéma II.1).



Réaction à 3 composants (3-CR)



Réaction à 4 composants (4-CR)

Schéma II.1. Principe des réactions multicomposants.

Par analogie avec les multiples fonctions du célèbre couteau suisse, ces réactions constituent de véritables outils modulables permettant de mieux sonder le vaste espace chimique des molécules bioactives.<sup>192,193</sup> Nous verrons que ces réactions ne constituent qu'une première étape permettant un accès synthétique rapide à un ensemble encore plus vaste de châssis moléculaires *via* des réactions dites de « post-condensation ».

Enfin, nous ferons un tour d'horizon de leur utilisation en Chimie Médicinale et plus particulièrement, nous ferons un état de l'art de leur emploi dans la recherche de traitements contre la maladie d'Alzheimer.

## I.2 Historique des réactions multicomposants

Une des toutes premières réactions à proprement dite « multicomposants » est la réaction de Strecker. Décrite en 1850, elle combine un aldéhyde, une amine et une source de cyanure pour former des  $\alpha$ -aminonitriles, qui après hydrolyse acide, donnent des  $\alpha$ -aminoacides (Schéma II.2).<sup>194,195</sup>

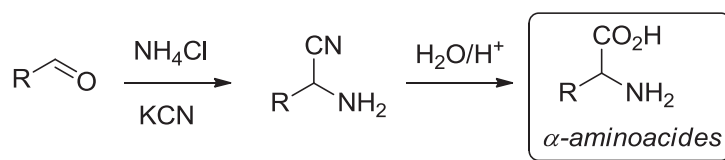


Schéma II.2. Réaction de Strecker.

Une nouvelle avancée majeure est faite dans ce domaine en 1882, année où Hantzsch décrit pour la première fois la synthèse multicomposants d'hétérocycles. Ainsi, la condensation de 2 équivalents de  $\beta$ -cétoester, en présence d'ammoniac, sur 1 équivalent d'aldéhyde fournit des 1,4-dihydropyridines (1,4-DHP, Schéma II.3).<sup>196,197</sup>

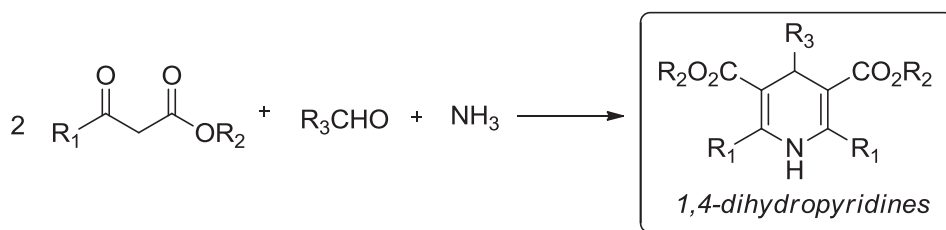


Schéma II.3. Réaction de Hantzsch.

En 1887, Döbner développe l'accès au noyau quinoléine à partir d'amines, d'aldéhydes et d' $\alpha$ -cétoesters énoles (Schéma II.4).<sup>198</sup>

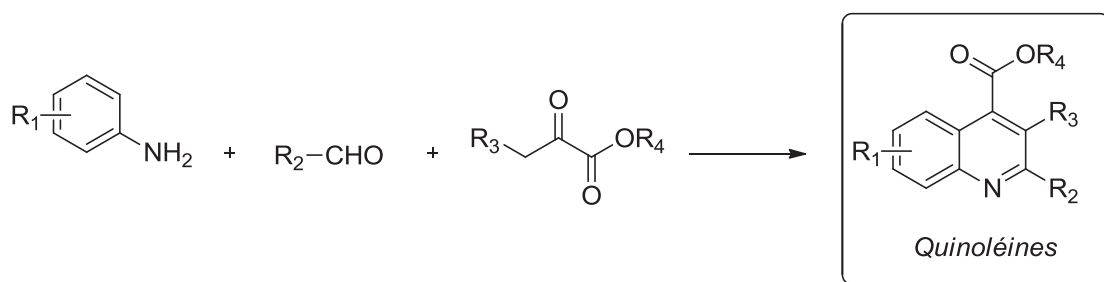


Schéma II.4. Réaction de Döbner.

En 1891, Biginelli publie une modification de la réaction de Hantzsch où il remplace l'ammoniac par une urée pour donner des 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones (DHPM, Schéma II.5).<sup>199,200</sup> Cette réaction est toujours très utilisée en chimie médicinale et nous verrons plus tard quelques applications dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

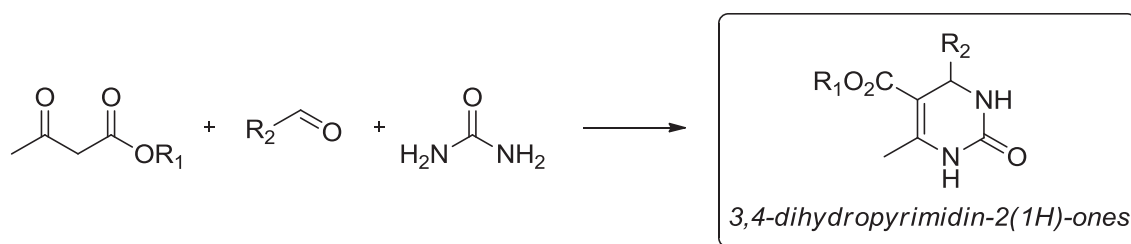


Schéma II.5. Réaction de Biginelli.

La réaction de Mannich publiée en 1912, constitue l'une des plus populaire RMC.<sup>201</sup> Elle met en jeu un composé carbonyle énoles, une amine secondaire et un aldéhyde pour former des  $\beta$ -aminocétones (Schéma II.6).

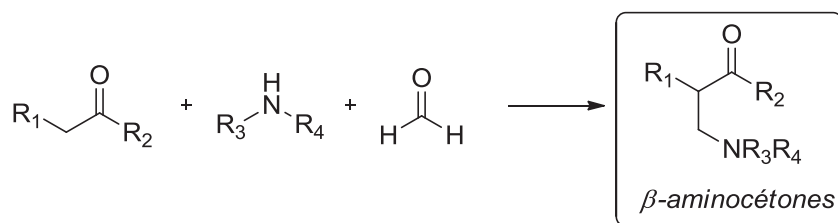


Schéma II.6. Réaction de Mannich.

Plus tard en 1917, la grande flexibilité synthétique de la réaction de Mannich a permis à Robinson la synthèse d'un alcaloïde naturel : la tropinone (Schéma II.7).<sup>202</sup>

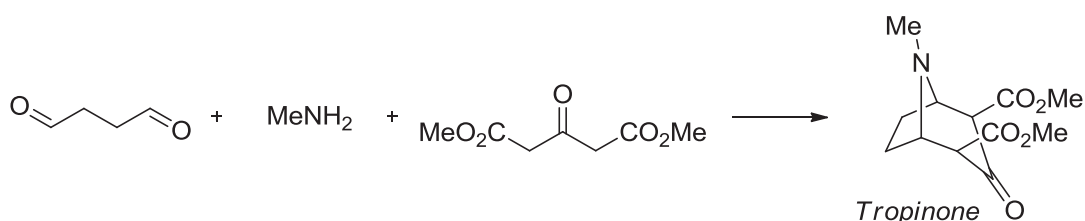


Schéma II.7. Synthèse de la tropinone par Robinson *via* la réaction de Mannich.

Une variante de la réaction de Mannich est publiée en 1993 par Petasis et met en jeu un aldéhyde, une amine et un acide boronique vinylique ou aromatique.<sup>203</sup> Cette réaction est une méthode de choix pour accéder en une étape à des  $\alpha$ -aminoacides *N*-substitués non naturels à partir de l'acide glyoxylique.<sup>204</sup> L'avantage par rapport à la méthode de Strecker est que l'on n'utilise pas de cyanure de potassium, connu pour être un poison mortel (Schéma II.8).

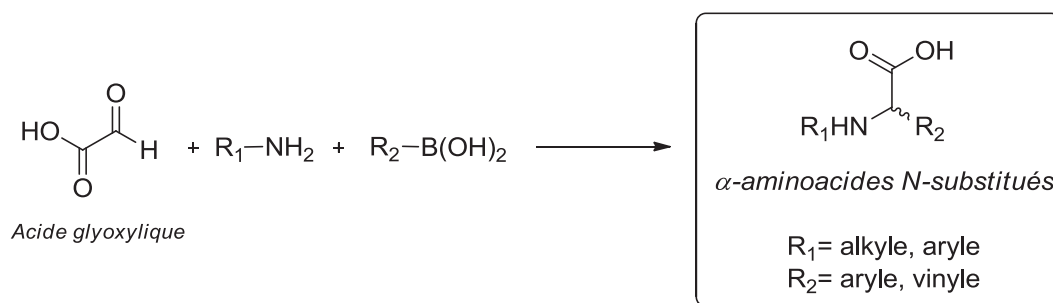


Schéma II.8. Synthèse d' $\alpha$ -aminoacides par réaction de Petasis.

Très peu de réactions multicomposants impliquent directement l'atome de phosphore. Parmi celles-ci, nous pouvons citer la réaction de Kabachnik-Fields découverte en 1952.<sup>205,206</sup> Elle met en jeu un dérivé carbonyle (cétone ou aldéhyde), une amine et un dialkylphosphonate pour donner des  $\alpha$ -aminophosphonates. Ces composés sont des bioisostères d' $\alpha$ -aminoacides (Schéma II.9).

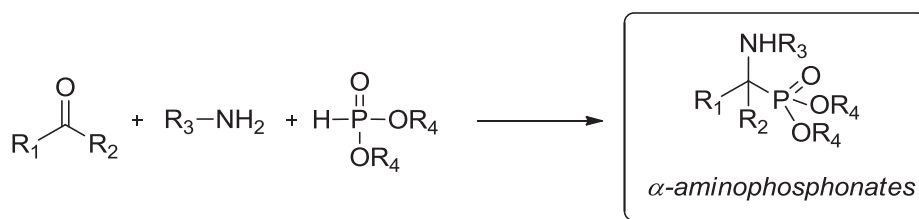


Schéma II.9. Réaction de Kabachnik-Fields.

Povarov décrit en 1963 une variante de la cycloaddition de Diels-Alder faisant intervenir une imine conjuguée, issu de la condensation d'une amine aromatique sur un aldéhyde, et des diénophiles très variés pour former des tétrahydroquinoléines polysubstituées.<sup>207</sup> Quelques versions énantiosélectives de cette réaction ont été rapportées récemment (Schéma II.10).<sup>208,209</sup>

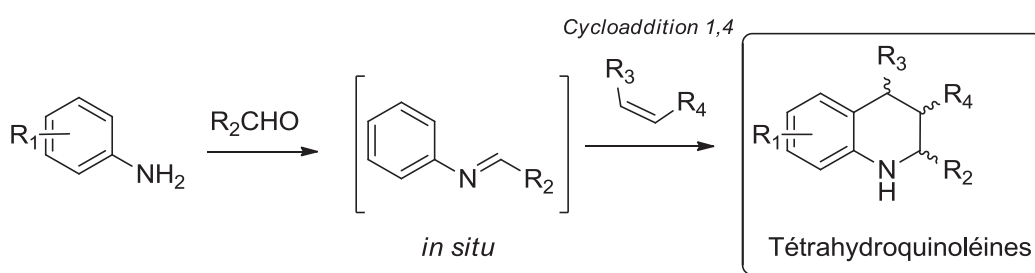
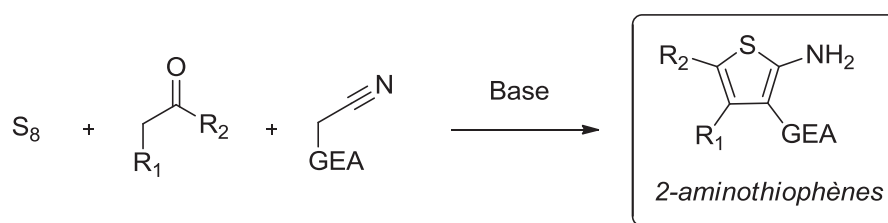


Schéma II.10. Réaction de Povarov.

En 1966, Gewald a eu l'idée d'utiliser du soufre élémentaire en combinaison avec une cétone énolisable et un nitrile appauvri en électrons (ester, nitrile, aryle) en présence d'une base pour synthétiser des 2-aminothiophènes hautement fonctionnalisés en une étape (Schéma II.11).<sup>210</sup>



GEA= groupement électroattracteur: ester, nitrile, aryle

Schéma II.11. Réaction de Gewald.



Ces travaux fondateurs ont suscité un grand intérêt tout au long du XX<sup>ème</sup> siècle. La découverte et l'utilisation progressive d'une nouvelle classe de composés chimiques, les isonitriles, a permis le développement exponentiel de nouvelles réactions multicomposants. On parle alors de « réactions multicomposants basées sur les isonitriles, RMCI » ou « *isocyanide-based multicomponent reactions, IMCR* » en anglais. Nous allons, par la suite, explorer les différentes possibilités synthétiques qu'offrent les isonitriles dans le cadre des réactions multicomposants,<sup>211,212</sup> et par extension, en synthèse dirigée vers la diversité appliquée à la Chimie Médicinale.

## II. Isonitriles et RMC

### II.1 Les isonitriles

#### II.1.1 Synthèses

En 1859, Lieke a synthétisé de manière fortuite, le premier isonitrile en mettant en réaction, un iodure d'allyle avec du cyanure d'argent.<sup>213</sup> Cependant, il n'a pas été en mesure d'identifier ce qu'il avait synthétisé (Schéma II.12). Cet isonitrile n'a été identifié formellement que quelques années plus tard par Gautier<sup>214,215</sup> et Hofman.<sup>216</sup>



Schéma II.12. Première préparation d'isonitrile par Lieke.

Durant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, différentes voies de synthèse ont été proposées mais se sont révélées complexes et inefficaces. Cela explique, partiellement, le faible développement de la chimie des isonitriles pendant cette période. De plus, l'odeur extrêmement irritante et pénétrante qui se dégage de certains isonitriles simples (isocyanoalkyles : MeNC, *t*BuNC, BnNC) a refoulé l'enthousiasme d'un certain nombre de chimistes.

Le véritable renouveau de cette chimie se produit dans les années 1960 grâce notamment à Ugi et ses collègues. Il développe deux nouvelles méthodes fiables et robustes de synthèse des isonitriles qui ouvrirent la voie vers le développement de plusieurs RMCI.

La première méthode est issue directement des travaux pionniers d'Hofmann qui, en 1867, propose la préparation d'isonitriles par réaction d'une amine primaire avec le chloroforme, en présence de potasse comme base.<sup>216</sup> Cette méthode dite « carbylamine » d'Hofmann, souffre néanmoins de beaucoup de défauts comme le faible nombre d'amines pouvant réagir et la formation de produits secondaires (Schéma II.13).

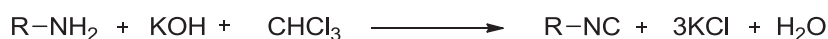


Schéma II.13. Synthèse d'isonitrile par la méthode carbylamine d'Hofmann.

Nef présente en 1897, un mécanisme réactionnel pour la réaction d'Hofmann.<sup>217</sup> La réaction d'un dichlorocarbène, généré *in situ* par la réaction du chloroforme et de la potasse, sur une amine forme l'isonitrile après élimination de deux molécules de chlorure d'hydrogène (Schéma II.14).

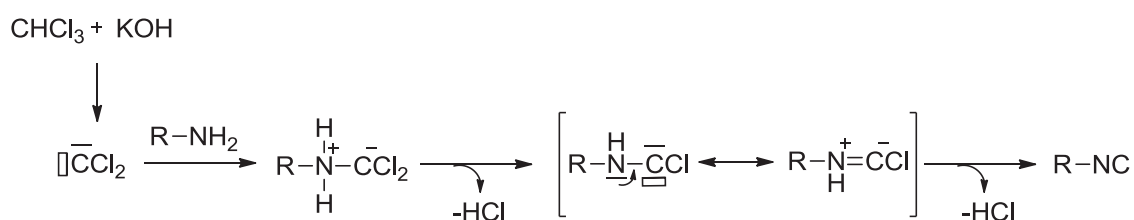


Schéma II.14. Mécanisme proposé par Nef pour la réaction d'Hofmann.

En 1972, Weber Gokel et Ugi développent une version améliorée de la méthode carbylamine d'Hofmann. Celle-ci utilise un catalyseur de transfert de phase de type ammonium quaternaire dans un mélange bi-phasique dichlorométhane/eau.<sup>218</sup> Cette voie facilite les étapes de déprotonation et améliore la sélectivité de l'addition du dichlorocarbène sur l'amine, limitant ainsi la génération de sous-produits (Schéma II.15).

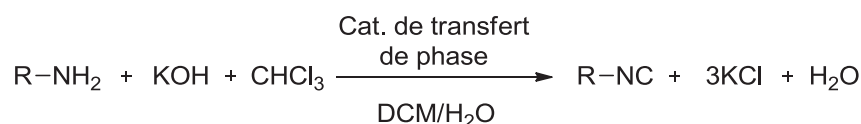


Schéma II.15. Méthode carbylamine d'Hoffman revisité par Weber *et al.*

La seconde méthode de synthèse repose sur la déshydratation de *N*-formamides monosubstitués issus d'amines primaires. La première version utilisait du phosgène, dont la forte toxicité rendait son usage difficile par les chimistes.<sup>219</sup> Une alternative fut ensuite d'utiliser d'autres agents de déshydratation plus facilement manipulables (oxychlorure de phosphore, pentoxyde de phosphore, chlorure de thionyle en association avec le DMF, tribromure de phosphore) en présence d'une base (généralement une trialkylamine comme la *N,N*-diisopropyléthylamine, DIPEA ou la triéthylamine, TEA) pour donner l'isonitrile (Schéma II.16).<sup>220,221</sup>

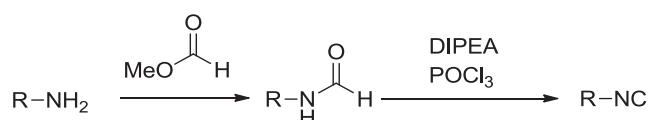
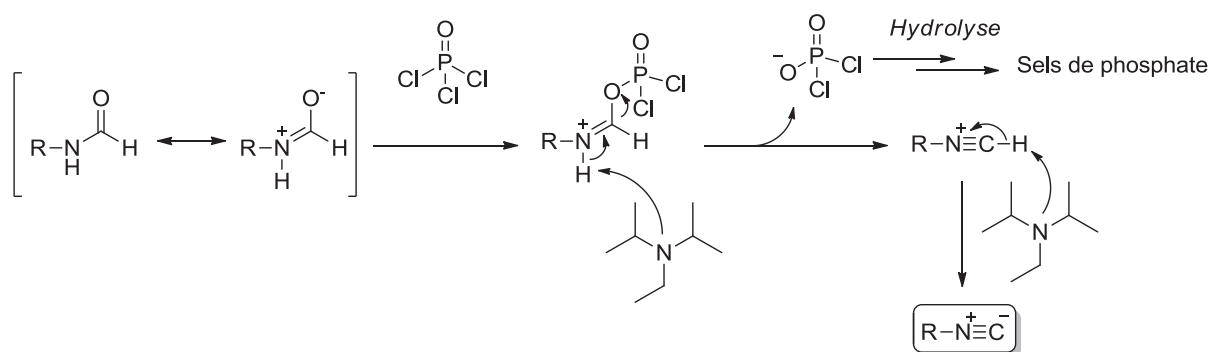


Schéma II.16. Déshydratation des *N*-formamide à l'aide du couple DIPEA/POCl<sub>3</sub>.

Le mécanisme de cette déshydratation peut commencer par l'attaque nucléophile de l'atome d'oxygène du mésomère iminoalcoolate du *N*-formamide sur l'atome de phosphore de l'oxychlorure de phosphore. On forme alors un cation iminium dont l'atome d'hydrogène est capté par la DIPEA. Le cation nitrilium qui en résulte perd à nouveau un atome d'hydrogène sous l'action de la DIPEA pour donner l'isonitrile. L'excès d'oxychlorure de phosphore est finalement transformé en phosphate par hydrolyse basique. (Schéma II.17).


Schéma II.17. Mécanisme de déshydratation des *N*-formamides avec le couple DIPEA/ $\text{POCl}_3$ .

Bien que la méthode précédente soit très utilisée de nos jours, une nouvelle procédure de déshydratation des *N*-formamides, utilisant le réactif de Burgess, est décrite en 1998 par Creedon *et al.*<sup>222</sup> Cet agent déshydratant est réputé doux notamment pour la déshydratation des alcools secondaires et tertiaires en alcènes.<sup>223</sup> En effet, les conditions utilisant des agents de déshydratation chlorés rends difficile l'emploi de *N*-formamides chiraux ou fonctionnalisés par des groupements sensibles à leur action comme les groupements silylés. Le réactif de Burgess s'est révélé être chimiosélectif avec des *N*-formamides diversement fonctionnalisés. Il déshydrate aussi bien les *N*-formamides aliphatiques que leurs homologues aromatiques. De plus, il permet la synthèse d'isonitriles chiraux avec rétention de configuration sans racémisation préalable du centre chiral (Schéma II.18). Ce réactif commercial est bien adapté pour la synthèse d'isonitriles sophistiqués et il a été retenu dans notre laboratoire pour synthétiser nos isonitriles.

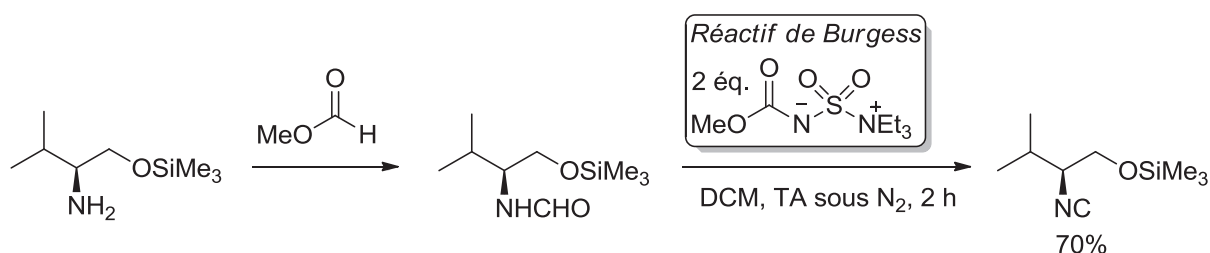


Schéma II.18. Synthèse d'isonitriles par déshydratation avec le réactif de Burgess.

Il n'existe pas de mécanisme publié sur la déshydratation des *N*-formamides par le réactif de Burgess. Nous nous sommes donc inspirés de la déshydratation avec l'oxychlorure de phosphore et de la déshydratation des alcools secondaires avec le réactif de Burgess pour

proposer un mécanisme plausible. Celui-ci débute par l'attaque de la forme mésomère iminoalcoolate du *N*-formamide sur l'atome de soufre de la fonction diazasulfone. Le cation iminium issu de cette addition perd alors un atome d'hydrogène pour donner un cation nitrilium qui sous l'action de l'anion sulfamate, fournit l'isonitrile (Schéma II.19).

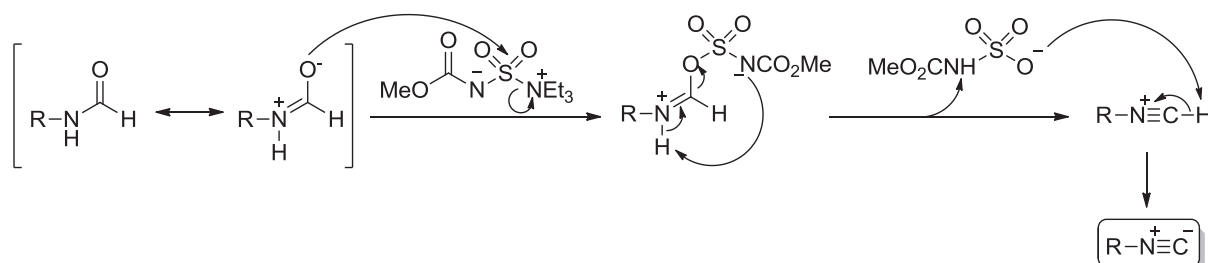


Schéma II.19. Mécanisme de déshydratation des *N*-formamides avec le réactif de Burgess.

La chimie en flux continu (*Flow Chemistry* en anglais) a également contribué à améliorer la méthode de synthèse des isonitriles par déshydratation des *N*-formamides. Dans ce contexte, Sharma *et al.* ont développé un système micro-fluidique permettant la génération en continu d'isonitrile, par déshydratation avec l'oxychlorure de phosphore et la DIPEA et sans émanations de vapeurs odorantes.<sup>224</sup> Les isonitriles ainsi générés *in situ* sont ensuite utilisés, toujours en flux continu, dans différentes RMCI (Passerini, Ugi) (Schéma II.20).

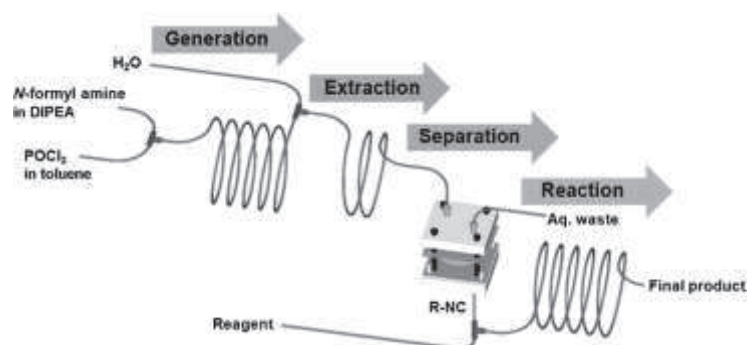


Schéma II.20. Dispositif en flux continu dédié à la génération *in-situ* d'isonitriles.<sup>224</sup>

Des composés comme les isocyanates ou les isothiocyanates, peuvent être réduits en isonitriles par différents agents réducteurs. Le triéthylphosphite permet la réduction des isocyanates tandis que les isothiocyanates nécessitent l'usage de triphénylphosphine,

d'hydruure de triphénylétain ou de cuivre. Ces réductions se déroulaient souvent à des températures élevées et l'isonitrile formé finissait par polymériser. Cela limitait l'usage de ce procédé. Une alternative, permettant de travailler à des températures plus acceptables (34-36°C), est d'utiliser soit le 1,3-diméthyl-2-phényl-1,3,2-diazaphospholidine, soit le diphenyl-*tert*-butylsilyllithium ou un mélange trichlorosilane-triéthylamine (Schéma II.21).<sup>225-227</sup>

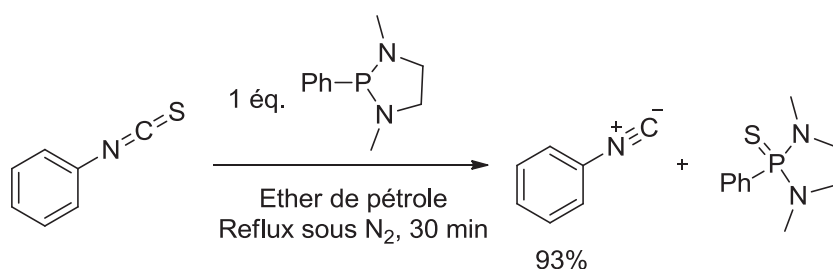


Schéma II.21. Synthèse d'isonitriles par réaction d'oxydoréduction.

Certains isonitriles possèdent une odeur tellement fétide et écœurante que l'armée américaine les a considérés un temps pour devenir des armes non létales.<sup>228,229</sup> Néanmoins, en travaillant sur la synthèse d'isonitrile par ouverture de cycle oxazole, le groupe de Pirrung a remarqué que les isonitriles ainsi synthétisés n'avaient pas leurs odeurs habituellement repoussantes. Bien au contraire, certains isonitriles sentaient la cerise ou le bonbon par exemple (Schéma II.22).

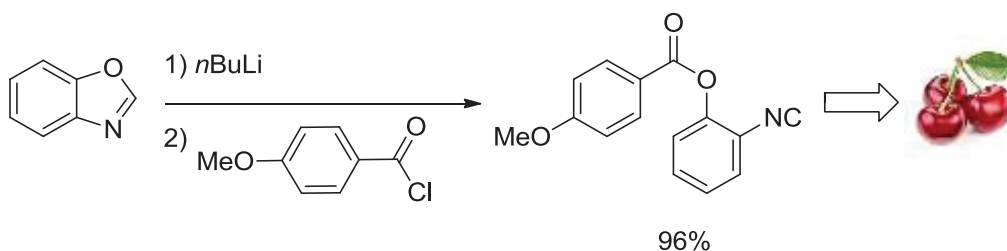


Schéma II.22. Synthèse d'isonitriles par ouverture du cycle oxazole.

Une version améliorée de la synthèse de Lieke a été développée par El Kaïm *et al.* Cette méthode met en jeu les cyanures d'argent et de potassium avec un halogénure benzylique ou allylique en présence d'une quantité catalytique de chlorure de triéthylbenzylammonium (TEBAC) à 80°C dans l'acétonitrile. Les isonitriles ainsi formés *in situ* peuvent être par la suite engagés dans différentes RMCI (Schéma II.23).<sup>230-232</sup>

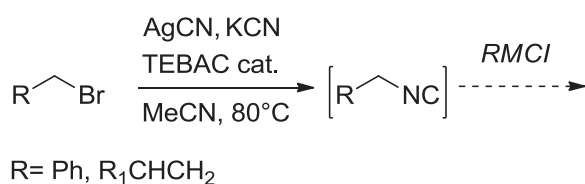


Schéma II.23. Synthèse *in situ* d'isonitriles.

## II.1.2 Structures et réactivités des isonitriles

### II.1.2.1 Structures

Les isonitriles ont longtemps constitué une vraie énigme quant à leur structure réelle. Une première représentation leur a été attribuée à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Elle décrit la fonction isonitrile sous une forme carbénique contenant un atome de carbone divalent.

Plus tard, une étude menée en 1930 par Lindemann et Wiegrebé démontre que les isonitriles existent également sous une forme zwitterionique.<sup>233</sup> Cependant, la forme carbénique reste prépondérante par rapport à la forme zwitterionique comme l'atteste une étude théorique récente sur ces espèces.<sup>234</sup> Le zwitterion peut être identifié par spectrométrie Raman où la bande entre 1960 et 2400 cm<sup>-1</sup> montre sans ambiguïté la présence de la liaison triple. Cette hybridation sp confère une structure linéaire à l'enchaînement C-N-C (Schéma II.24).

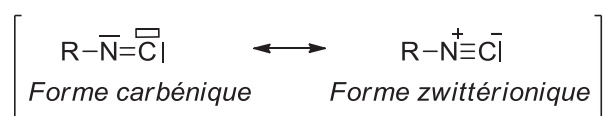


Schéma II.24. Représentations d'un isonitrile.

De plus, l'étude des orbitales frontières des isonitriles a montré que les plus grands coefficients électroniques sont situés sur la HO (Haute Occupée) et la BV (Basse Vacante) de l'atome de carbone, c'est donc lui qui va réagir, à la fois comme centre nucléophile et électrophile.<sup>235</sup> De plus, le proton en α est acide (isonitriles aliphatiques avec groupements électroattracteurs, et dans une moindre mesure, benzyliques ou allyliques) (Schéma II.25).

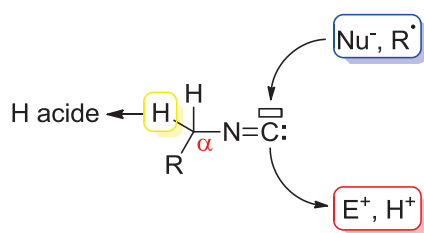


Schéma II.25. Les différents types de réactivité des isonitriles.

### II.1.2.2 Acidité du proton en $\alpha$

Le proton situé en  $\alpha$  de la fonction isonitrile acquiert un caractère légèrement acide. Ce caractère peut être exacerbé par la présence de substituants électroattracteurs tel qu'un groupement sulfonyle. En présence d'une base, il y a déprotonation et l'anion résultant est stabilisé par le groupement électroattracteur adjacent. Le carbanion généré peut ainsi réagir sur un électrophile. Cette réactivité a été mise à profit par Van Leusen et Schöllkopf pour la synthèse, entre autres, d'imidazoles<sup>236</sup> (à partir d'imines), d'oxazoles<sup>237,238</sup> (à partir d'aldéhydes) ou de thiazoles<sup>239</sup> (à partir de thioaldéhydes).

Un mécanisme général est représenté dans le schéma II.26. Il y a tout d'abord déprotonation en  $\alpha$  du tosylméthylisonitrile (TosMIC) par une base (carbonate de potassium par exemple) puis attaque nucléophile du carbanion sur le centre électrophile. L'espèce générée cyclise puis, par élimination d'acide *p*-toluènesulfonique, on obtient les différents azoles.

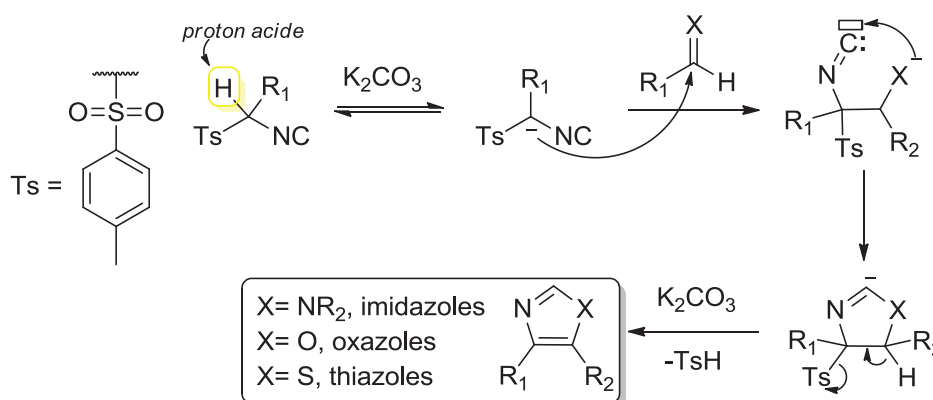


Schéma II.26. Synthèse d'azoles à partir du TosMIC (réaction de Van Leusen).



### II.1.2.3 Réactivité radicalaire

Un radical peut facilement s'additionner sur un isonitrile pour former un radical imidoyle. Celui-ci peut alors, soit se fragmenter en radical alkyle et former un nitrile, soit être piégé par un alcène, un alcyne, un aromatique ou encore un composé carbonylé. Ce piégeage peut avantageusement se dérouler de manière intramoléculaire et former un cycle (Schéma II.27).

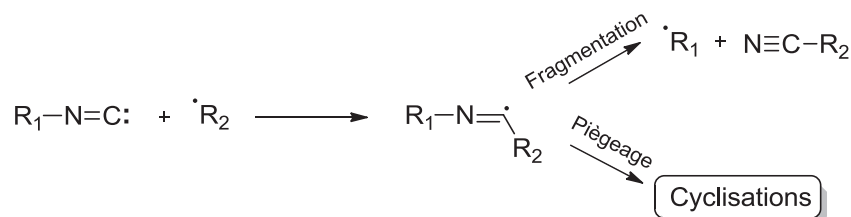


Schéma II.27. Réactivité radicalaire des isonitriles.

Cette réactivité a été appliquée récemment par le groupe de Studer pour la synthèse de 6-trifluorométhylphénanthridines *via* la trifluorométhylation radicalaire d'isonitriles (Schéma II.28).<sup>240</sup>

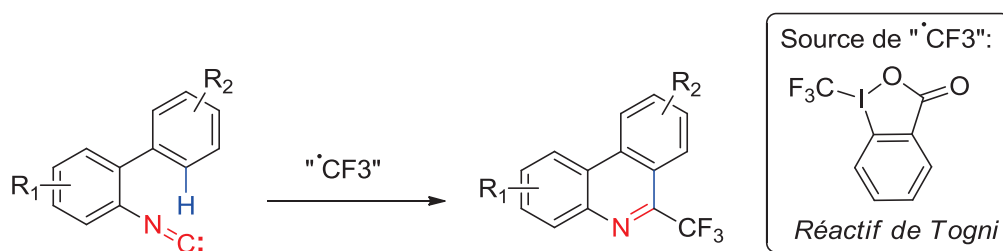


Schéma II.28. Exemple de cyclisation radicalaire impliquant un isonitrile.

### II.1.2.4 Réactivité du carbone terminal

Nous avons vu précédemment que le carbone terminal d'un isonitrile possède à la fois un caractère électrophile et nucléophile. Ce dernier peut alors subir toute une variété d' $\alpha$ -additions avec des électrophiles et nucléophiles. Cependant, l'imide que l'on forme *via* cette transformation est souvent enclin à des réarrangements intramoléculaires (Schéma II.29).



Schéma II.29. Réactivité unique du carbone terminal.

Les isonitriles peuvent subir une  $\alpha$ -addition par les acides carboxyliques. On forme dans un premier temps un imidate qui se réarrange par transfert d'acyle, en formamide (Schéma II.30).

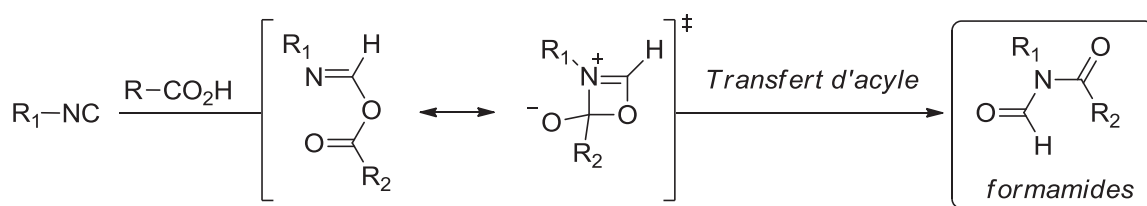


Schéma II.30.  $\alpha$ -addition d'acide carboxylique sur un isonitrile.

En 1984, Nef décrit l' $\alpha$ -addition d'un chlorure d'acide sur un isonitrile pour former un chlorure d'imidoyle.<sup>241</sup> Ce dernier peut être, par la suite, hydrolysé en  $\alpha$ -cétocarboxamide (Schéma II.31).

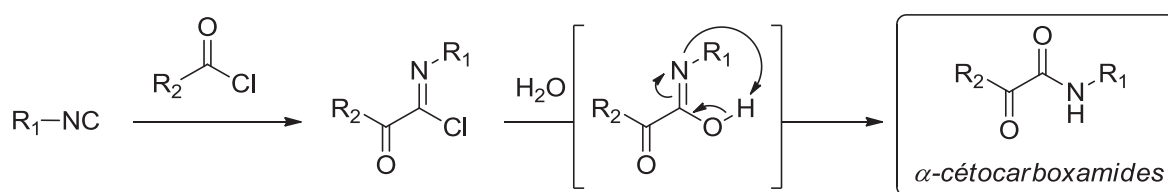


Schéma II.31.  $\alpha$ -addition d'un chlorure d'acyle sur un isonitrile.

Les composés organométalliques tels que les organomagnésiens et les organolithiens s'additionnent également sur le carbone terminal des isonitriles. Cette  $\alpha$ -addition conduit dans un premier temps à une espèce métallo-alimine qui peut par la suite, capter un électrophile pour former après hydrolyse, un composé carbonylé (Schéma II.32).<sup>242</sup>

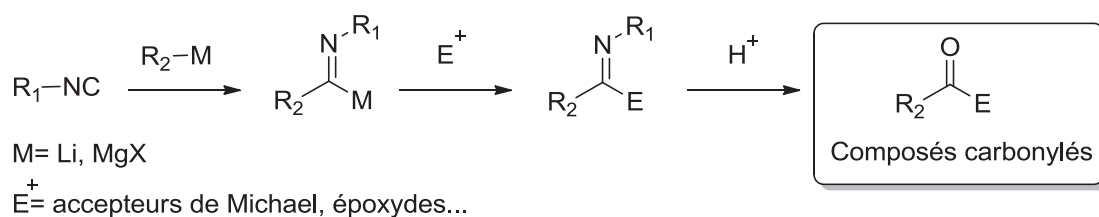


Schéma II.32.  $\alpha$ -addition d'un organométallique sur un isonitrile.

Comme nous allons le voir par la suite, La réactivité si particulière du carbone terminal de l'isonitrile est pleinement exploitée dans les réactions multicomposants comme les réactions de Passerini et de Ugi.

## II.2 La réaction de Passerini (P-3CR)

En dépit du faible développement de la chimie des isonitriles durant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, une nouvelle réaction impliquant les isonitriles fut néanmoins découverte en 1921 par Passerini. Ce dernier a développé la synthèse d' $\alpha$ -acyloxy-carboxamides basée sur la condensation d'un isonitrile sur un dérivé carbonylé activé (aldéhyde ou cétone) et un acide carboxylique (Schéma II.33).<sup>243,244</sup>

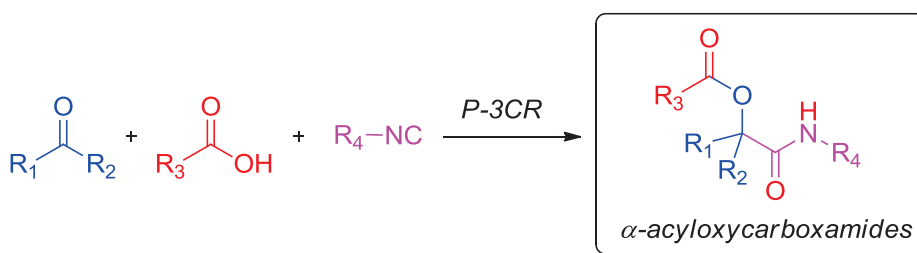


Schéma II.33. La réaction à trois composants de Passerini (P-3CR).

Bien qu'on puisse réaliser cette manipulation dans un solvant polaire tel que le méthanol ou l'éthanol, la réaction se déroule à température ambiante plus rapidement en milieu apolaire avec des solvants comme le dichlorométhane ou le toluène. Une concentration élevée est également nécessaire pour des rendements élevés.

En 1961, Ugi propose un mécanisme concerté reposant sur les différences de réactivités dans différents solvants.<sup>245</sup> Ce mécanisme débute par l'activation du dérivé carbonyle par l'acide carboxylique *via* des liaisons hydrogènes puis l'isonitrile s'insère pour former un état de transition cyclique à 7 centres. L'imidate résultant subit alors un transfert intramoléculaire d'acyle, appelé réarrangement de Mumm,<sup>246</sup> pour fournir l' $\alpha$ -acyloxycarboxamide (Schéma II.34).

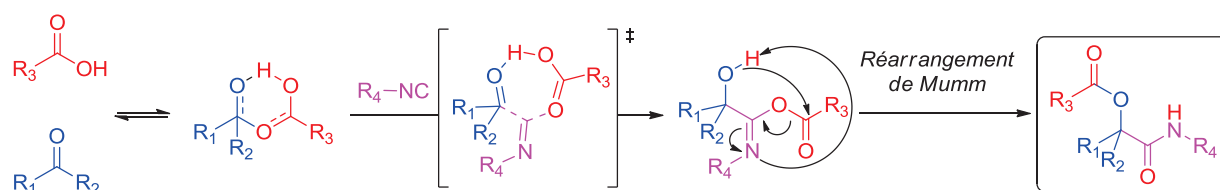


Schéma II.34. Mécanisme concerté selon Ugi de la réaction de Passerini.

### II.3 La réaction de Ugi (U-4CR)

En 1959, Ugi publie la variante de la réaction de Passerini qui redort véritablement le blason des réactions multicomposants.<sup>247</sup> Il a l'idée d'utiliser une imine, issue de la condensation d'un dérivé carbonyle avec une amine, pour former des  $\alpha$ -acylaminocarboxamides en une étape. Ces adduits poly-fonctionnalisés possédant 5 points de diversité structurale, fait de la réaction de Ugi une méthode de choix pour la génération de chimiothèques de composés pouvant être potentiellement testés sur diverses cibles biologiques.<sup>248</sup>

La réaction se déroule à température ambiante avec une concentration élevée en substrats de départ. Contrairement à la réaction de Passerini, l'utilisation de solvants polaires, permet d'accélérer la cinétique de la réaction. On peut citer l'usage de solvants protiques tels que le méthanol ou l'éthanol. D'autres solvant polaires non protiques peuvent aussi être utilisé comme le *N,N*-diméthylformamide (DMF) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Schéma II.35).

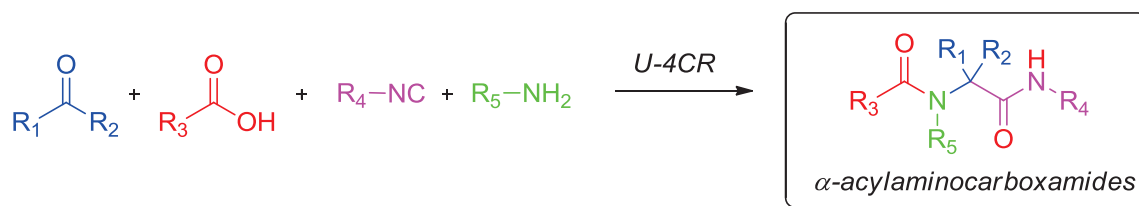


Schéma II.35. La réaction à 4 composants de Ugi (U-4CR).

Le mécanisme débute par la formation de l'imine à partir de l'aldéhyde et de l'amine. Cette étape est cruciale pour la formation du produit final. L'imine ainsi formée réagit avec l'acide pour fournir un cation iminium, beaucoup plus électrophile que l'imine et le composé carbonyle de départ. Cette dernière étape constitue la force motrice de la réaction. Le cation iminium est ensuite capturé par le carbone terminal de l'isonitrile pour donner un cation nitrilium qui après piégeage par l'anion carboxylate, forme l'imidate. Enfin, l'imidate instable se réarrange en amide pour former l'α-acylamino carboxamide. Cette dernière étape est irréversible et thermodynamiquement favorisée comme le confirme une étude théorique de ce mécanisme par Chéron *et al.* (Schéma II.36).<sup>249</sup>

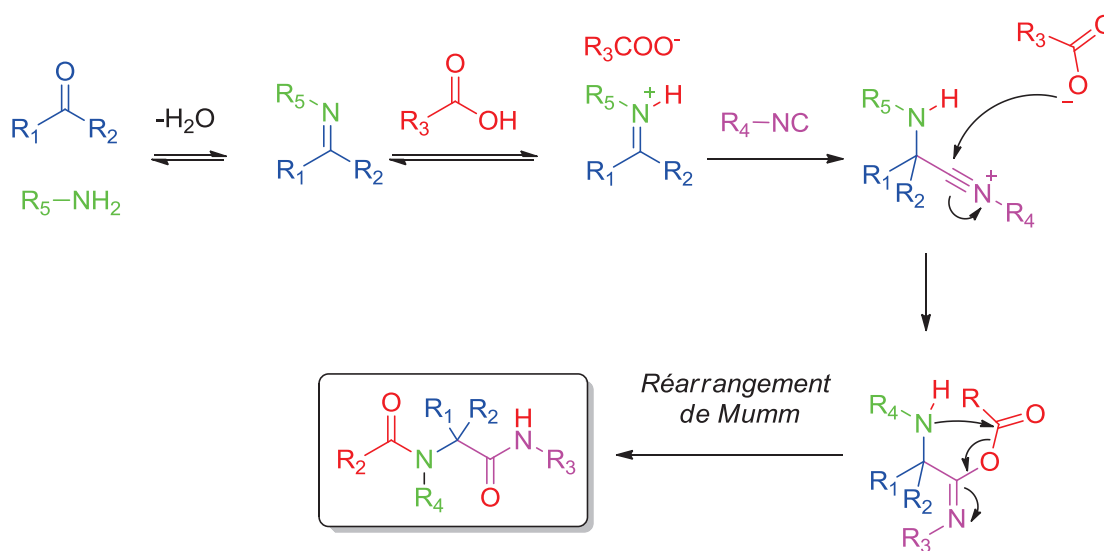


Schéma II.36. Mécanisme de la réaction de Ugi.

## II.4 Modifications de la réaction de Ugi

De nos jours, la réaction de Ugi constitue un outil synthétique important pour la synthèse de peptidomimétiques linéaires ou cycliques. Ainsi, la portée de cette réaction ne se limite pas qu'à la synthèse stricte d' $\alpha$ -acylaminocarboxamides.

### II.4.1 Variations autour de l'acide

Ugi a étendu le champ des réactifs possibles, en proposant d'autres partenaires acides (minéraux ou organiques) comme par exemple l'acide carbonique (ou l'équivalent  $\text{CO}_2/\text{MeOH}$ ), les acides thiocarboxyliques, l'acide azothydrique (ou son équivalent moins explosif, l'azoture de triméthylsilyle,  $\text{TMSN}_3$ ), le thiosulfate de sodium, le sélénure d'hydrogène ou les acides cyanique/thiocyanique pour former des carbamates, des  $\alpha$ -acylaminothiocarboxamides, des tétrazoles, des  $\alpha$ -aminochalcogénocarboxamides ou encore, des hydantoïnes (Schéma II.37).<sup>250,251</sup>

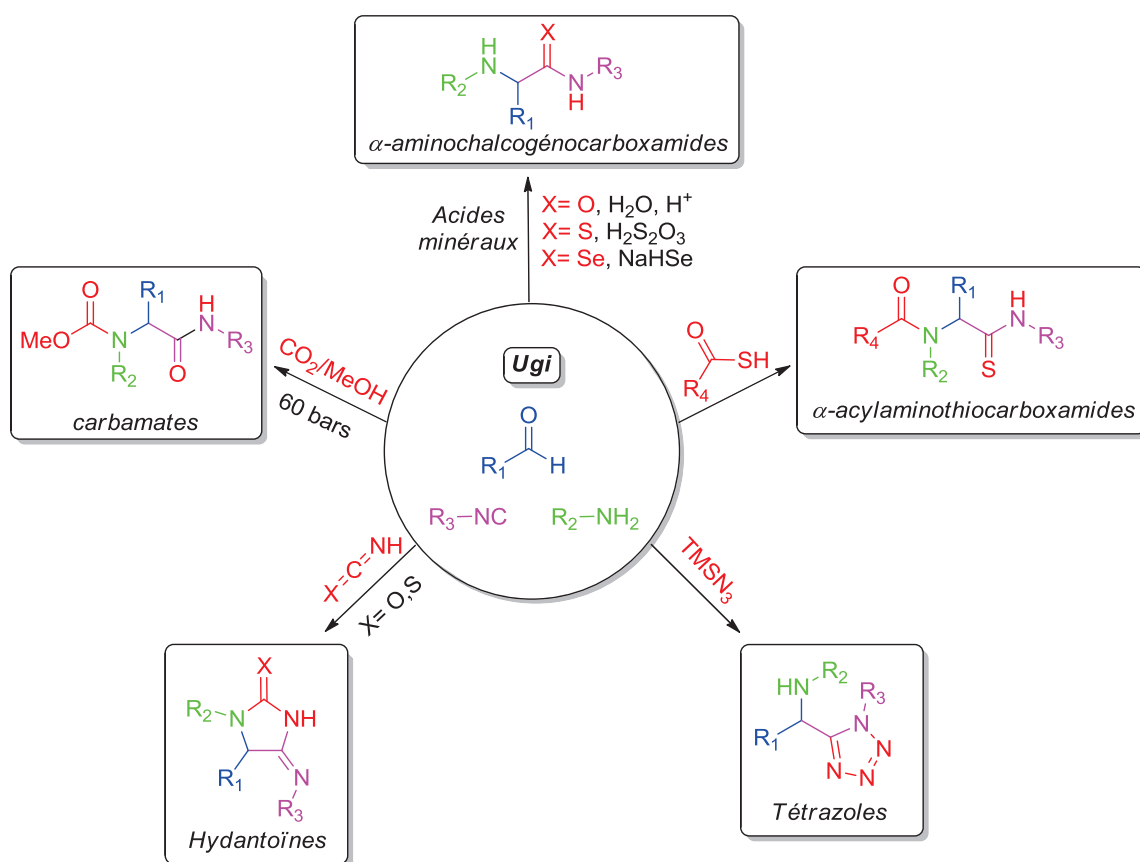


Schéma II.37. Variations autour de l'acide utilisé pour la réaction de Ugi.

D'autres part, El Kaïm *et al.* ont développé une nouvelle synthèse de *N*-arylcaboxamides à partir de phénols déficients en électrons comme les *ortho*- et *para*-nitrophénols ou les esters salicyliques.<sup>252</sup> Cette variation est nommée réaction de Ugi-Smiles. Le réaction de Passerini-Smiles existe aussi pour accéder à des *O*-arylcaboxamides.<sup>253</sup>

La présence de groupements électroattracteurs sur le phénol permet de l'activer et exacerbe l'acidité du proton de la fonction hydroxyle. Il peut dès lors remplacer l'acide dans la réaction de Ugi. Le mécanisme débute par la formation de l'imine, par condensation de l'amine et de l'aldéhyde. Celle-ci est ensuite protonée par le phénol pour former un iminium et réagit avec l'isonitrile. Le cation nitrilium résultant de l'addition précédente subit une addition nucléophile de l'anion phénolate pour former l'imidate. Enfin, ce dernier subit un réarrangement de Smiles pour donner un *N*-arylcaboxamide (Schéma II.38).

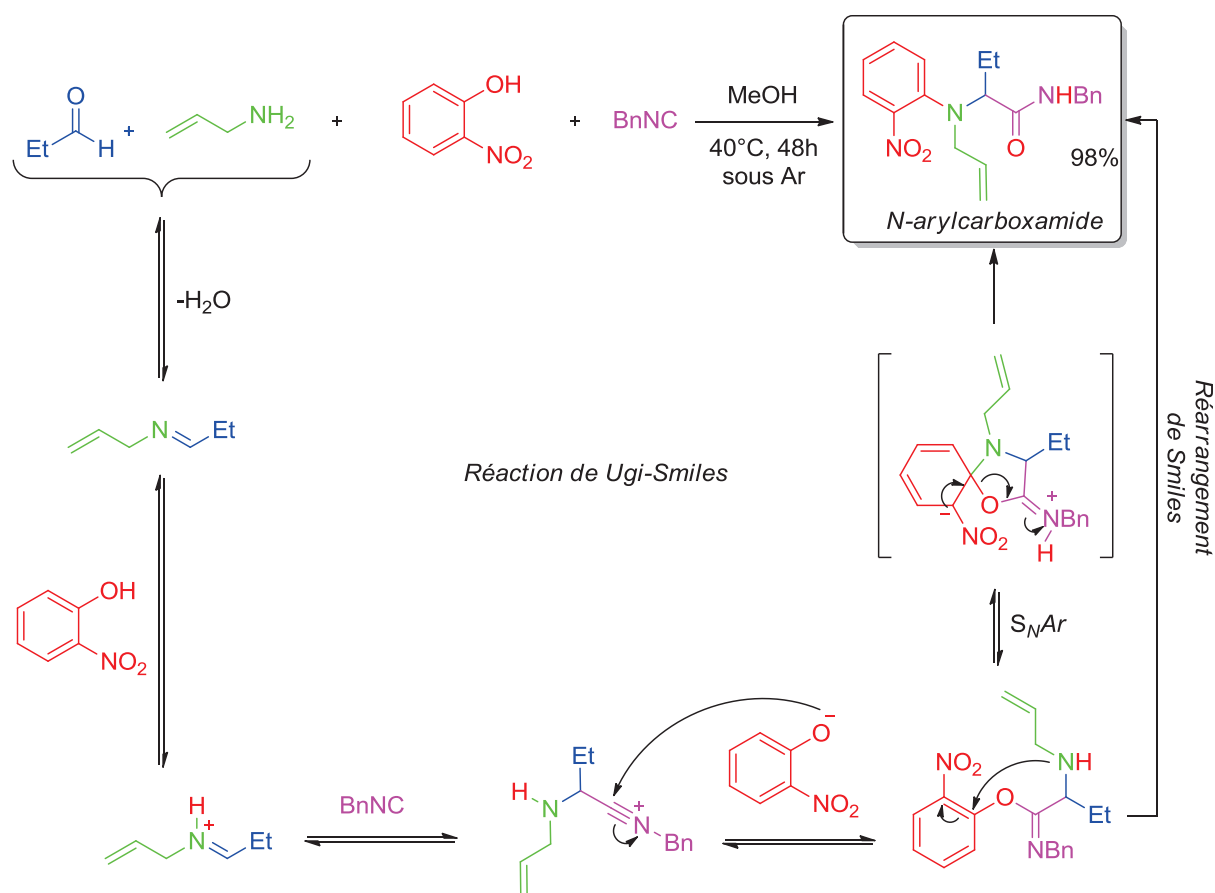


Schéma II.38. Réaction de Ugi-Smiles.

## II.4.2 Variations autour de l'amine

Nous avons vu quelques modifications autour de l'acide mais il est également possible de faire varier la nature de l'amine. Dans le réarrangement de Mumm de la réaction classique de Ugi, le transfert d'acyle se produit sur l'atome d'azote de l'amine primaire. Cependant, dans le cas d'amines secondaires, ce transfert est rendu impossible. C'est alors l'atome d'azote de l'isonitrile qui capture l'acyle et se réarrange en imide. Cela a été mis à profit par Ugi en 1961 pour la synthèse d'imides à partir d'énamines (issus de la condensation d'amines secondaires sur des aldéhydes) sur des d'acides carboxyliques et d'isonitriles.<sup>254</sup> Un exemple est présenté dans le schéma II.39.

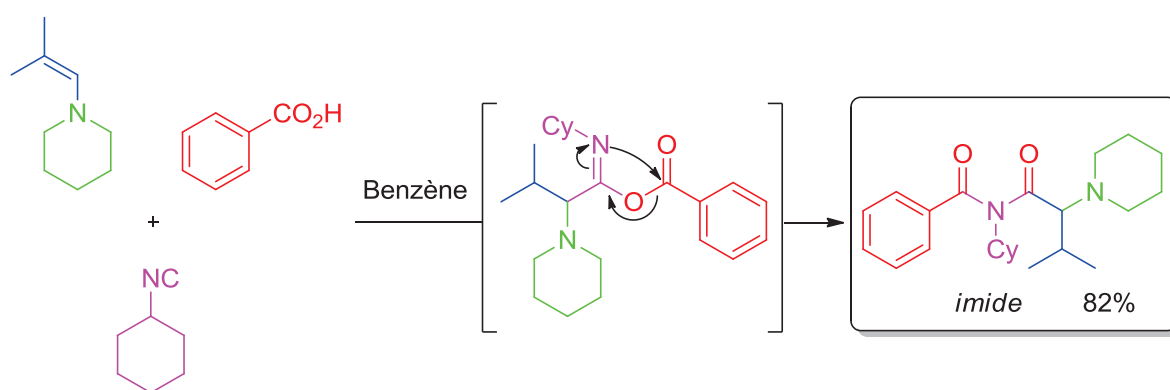


Schéma II.39. Exemple de préparation d'un imide à partir d'une amine secondaire.

Dans cette continuité, Le groupe de Tron a utilisé des bis-amines secondaires pour la synthèse de diamines tertiaires dissymétriques. Dans cette méthode, le transfert d'acyle se déroule sur la deuxième amine secondaire libre de la diamine (Schéma II.40).<sup>255</sup> Cette variation de Ugi est appelée réaction split-Ugi et permet la synthèse d'une grande variété de poly-amines analogues à celles décrites dans le chapitre I.<sup>256</sup>



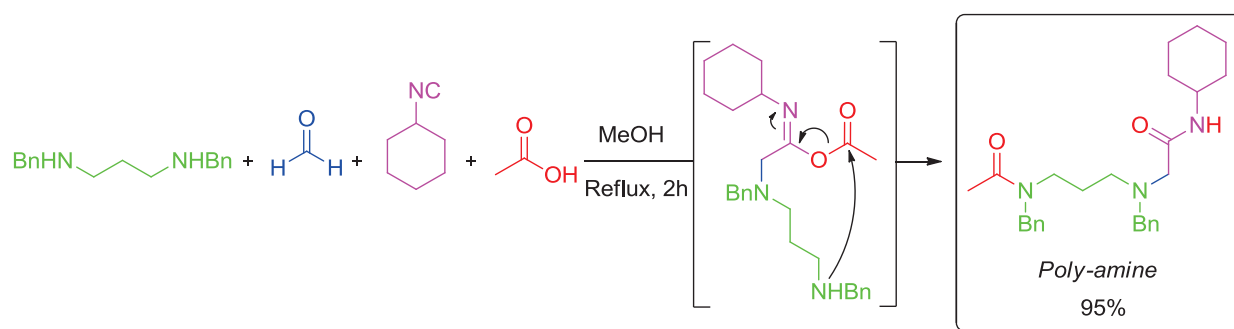


Schéma II.40. Réaction split-Ugi (sU-4CR).<sup>255</sup>

De manière plus générale, d'autres équivalents d'amines comme par exemple les hydrazines,<sup>257</sup> les hydrazides,<sup>258</sup> les hydrazones,<sup>259</sup> les hydroxylamines,<sup>260</sup> les urées ou les semicarbazones<sup>261</sup> peuvent servir de partenaires dans la réaction de Ugi.

Il est néanmoins important de signaler une dernière variation d'amine qui est l'utilisation de 2-aminoazines dans la réaction de Ugi. Cette variante s'appelle la réaction à trois composants de Groebke-Blackburn-Bienaymé, du nom des trois chercheurs l'ayant simultanément découverte en 1998. Ainsi, la réaction d'une 2-aminoazine, d'un aldéhyde et d'un isonitrile en présence d'une quantité catalytique d'acide de Brønsted ou de Lewis, fournit une 3-aminoimidazo[1,2-*a*]azine (Schéma II.41).<sup>262-264</sup>

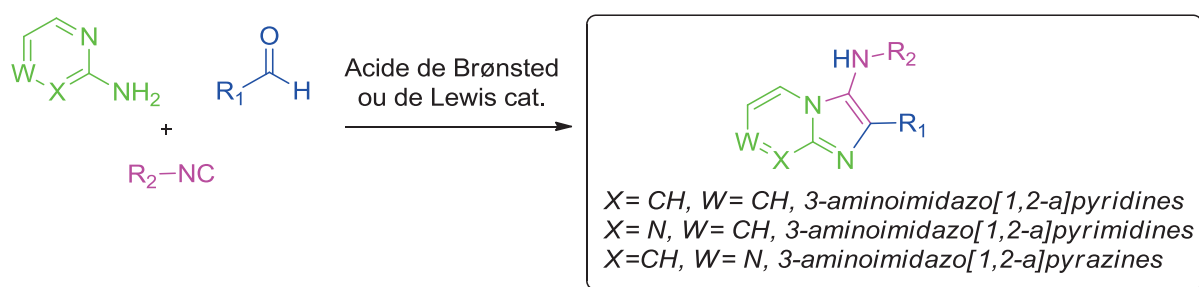


Schéma II.41. Réaction à trois composants de Groebke-Blackburn-Bienaymé.

Le mécanisme de cette réaction débute par la formation de l'imine. L'activation acide de l'imine permet ensuite une cyclo-addition [4+1] avec l'isonitrile pour fournir la 3-aminoimidazo[1,2-*a*]azine (Schéma II.42).

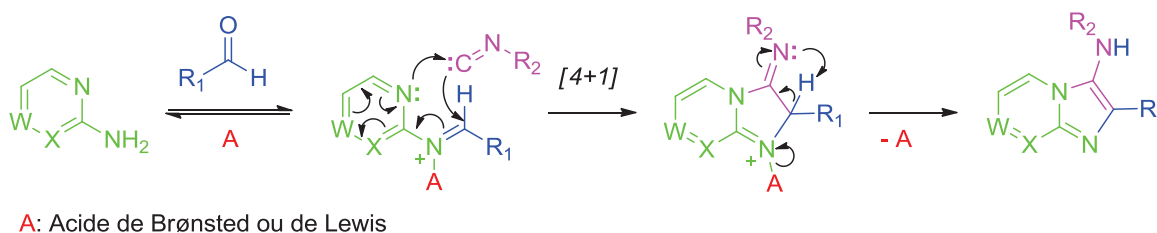


Schéma II.42. Mécanisme de la réaction de Groebke-Blackburn-Bienaymé.

### II.4.3 Variantes intramoléculaires

Plusieurs variantes intramoléculaires de la réaction de Ugi ont été étudiées, permettant d'accéder à de nombreux hétérocycles à partir de composés bifonctionnels. Parmi ces composés, on peut citer les oxo-acides,<sup>265</sup> les aminoacides<sup>266</sup> ou encore les aminoaldehydes.<sup>267</sup> Ainsi, Pirrung *et al.* a développé une synthèse en milieux aqueux de  $\beta$ -lactames *via* des oxo-acides (Schéma II.43).<sup>268</sup> Cette méthodologie est intéressante car de nombreux antibiotiques (pénicillines) comportent le motif  $\beta$ -lactame.

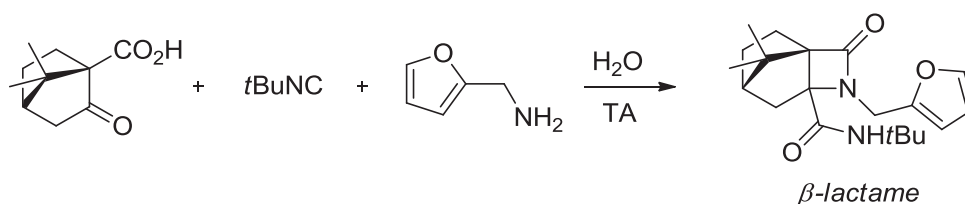


Schéma II.43. Synthèse d'un  $\beta$ -lactame par réaction intramoléculaire de Ugi.

## II.5 Stratégies de post-condensation d'adduits de Passerini

Les deux méthodologies de post-condensation d'adduits de Passerini, que nous nous apprêtons à voir, ont été développées par le groupe de Banfi. Elles reposent sur l'utilisation d'adduits de Passerini possédant une seconde fonction réactive pouvant être engagée dans une réaction secondaire.

### II.5.1 Stratégie PADAM

PADAM est l'acronyme de *Passerini reaction-Amine Deprotection-Acyl Migration*. Développée en 2002, cette méthode permet l'accès en trois étapes à des peptidomimétiques sans isoler les produits intermédiaires.<sup>269,270</sup>

La première étape correspond à la réaction de Passerini d'un aldéhyde comportant une amine protégée (Boc, Fmoc) avec un acide carboxylique et un isonitrile. L'adduit de Passerini obtenu possédant l'amine masquée est ensuite déprotégée *in situ*. Cela déclenche une migration d'acyle spontanée de l'atome d'oxygène à l'atome d'azote pour former l'adduit final. Ces adduits peuvent éventuellement être davantage transformés en  $\beta$ -acylamino- $\alpha$ -oxocarboxamides par oxydation de la fonction alcool secondaire des  $\beta$ -acylamino- $\alpha$ -hydroxycarboxamides (Schéma II.44).

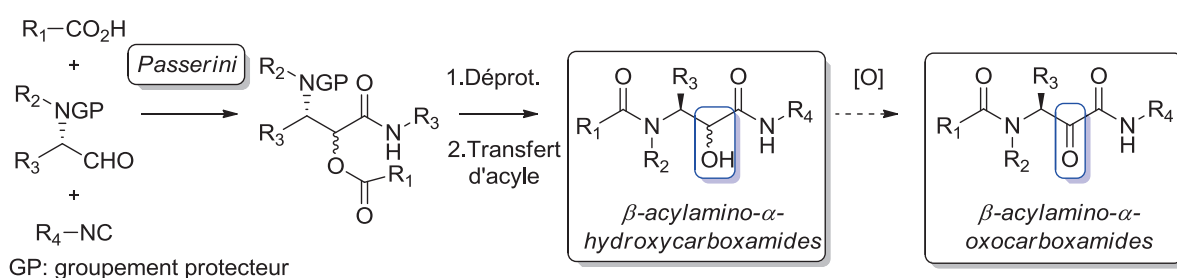


Schéma II.44. Stratégie PADAM.

### II.5.2 Stratégie OPHA

La stratégie OPHA ou *Oxidation-Passerini-Hydrolysis-Alkylation* a été développée en 2014.<sup>271</sup> Le groupe de Banfi s'est basé sur les travaux antérieurs de Zhu *et al.* concernant la réaction de Passerini « oxydante »<sup>272</sup> et a imaginé une séquence réactionnelle de 4 étapes se déroulant *one pot* : oxydation, réaction de Passerini, hydrolyse de l'ester et *O*-alkylation avec du bromure de propargyle. Un exemple de cette séquence est donné dans le schéma II.45. Le bis(acétoxy)iodobenzène de l'étape d'oxydation a un double rôle ici : il est le réactif d'oxydation pour le (2-azidophenyl)méthanol mais également la source d'acide acétique pour la réaction de Passerini. Une hydrolyse et une alkylation en présence d'un catalyseur de

transfert de phase fournit le composé désiré. Enfin, cet adduit peut être transformé en triazolobenzoxazépine par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen intramoléculaire.

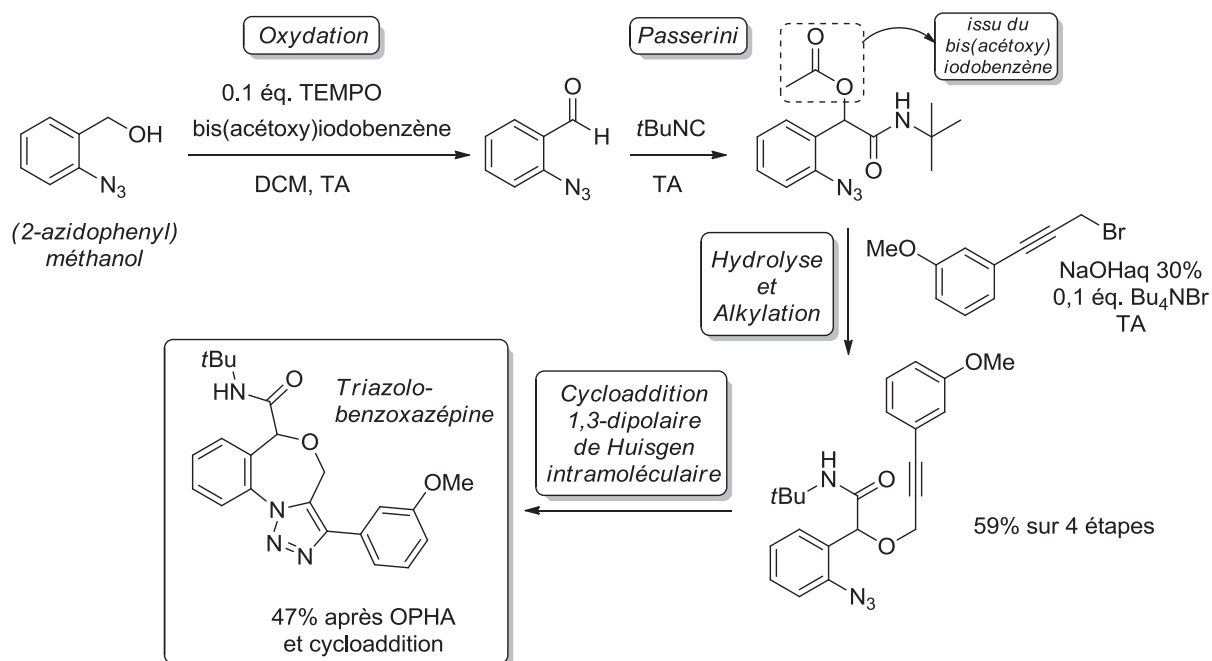


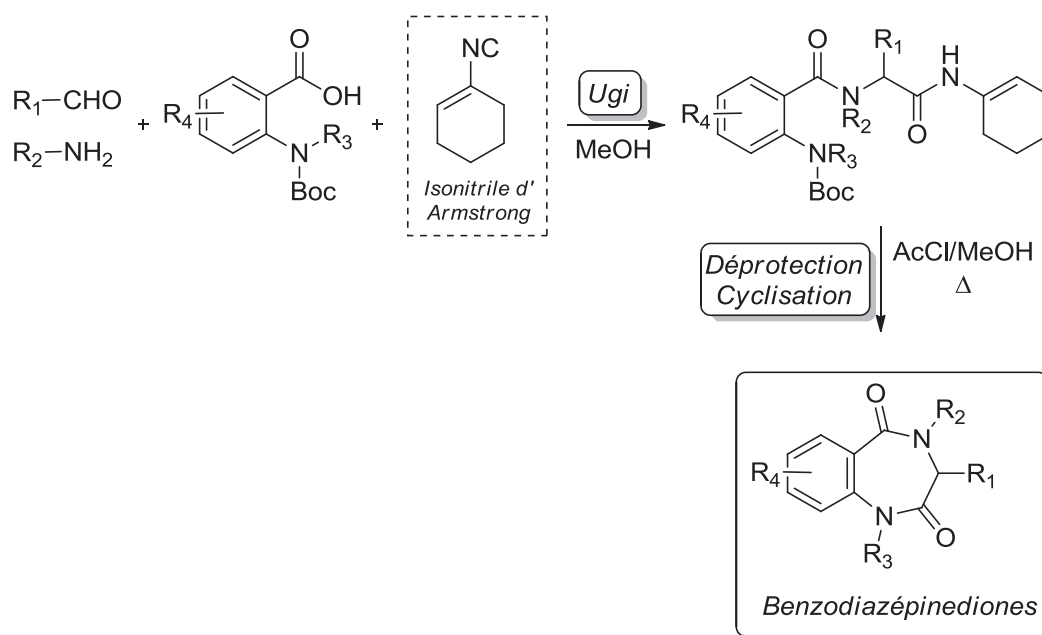
Schéma II.45. Stratégie OPHA et son utilisation dans la synthèse de benzoxazépines.

## II.6 Stratégies de post-condensation d'adduits de Ugi

Cette partie permet d'avoir une vue d'ensemble (non exhaustive) de la diversité structurale qu'il est possible d'atteindre en appliquant différentes méthodologies de post-condensation d'adduits de Ugi possédant des groupements fonctionnels orthogonaux.

### II.6.1 Stratégie UDC

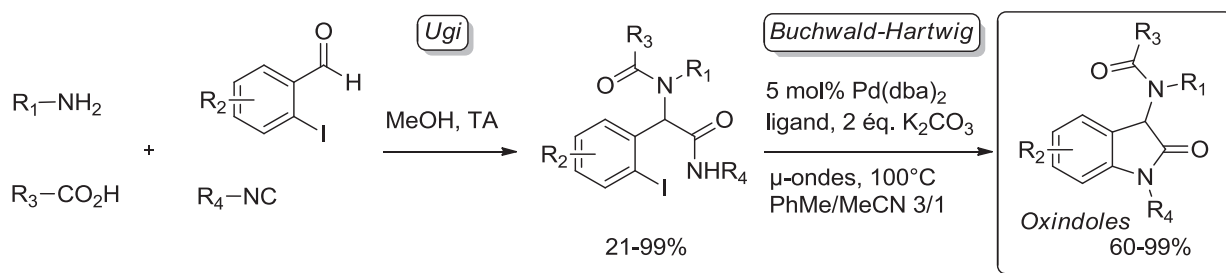
La stratégie UDC (*Ugi-Deprotection-Cyclisation*) a été développée par le groupe de Hulme. Elle repose sur l'utilisation d'un réactif (aldéhyde, acide ou amine) comportant une fonction amine protégée, dans la réaction de Ugi. Une fois l'adduit obtenu, celui-ci est déprotégé pour subir une réaction domino de cyclisation.<sup>273</sup> Ainsi, de nombreux châssis moléculaires ont été synthétisés *one-pot via* cette méthodologie comme les benzimidazoles,<sup>274</sup> les benzodiazépinédiones, les tétrazolodiazépinones,<sup>275</sup> les quinoxalinones,<sup>276</sup> les  $\gamma$ -lactames<sup>277</sup> ou les dicétopipérazines.<sup>278</sup> Le schéma II.46 montre la synthèse UDC de benzodiazépinédiones *via* l'emploi de l'isonitrile sacrificiel d'Armstrong.<sup>279</sup>



D'autres variantes de la stratégie UDC existent comme l'UAC (*Ugi-Activation-Cyclisation*) ou l'UDAC (*Ugi-Deprotection-Activation-Cyclisation*) pour la synthèse de peptidomimétiques cycliques.<sup>280</sup>

## II.6.2 Couplages organométalliques intramoléculaires

Un nombre important de post-condensations d'adduits de Ugi *via* des couplages organométalliques ont été développés ces dernières années. Parmi celle-ci, on peut citer les réactions de métathèse,<sup>281</sup> de carbocyclisation,<sup>282</sup> de Heck.<sup>283</sup> Le groupe de Zhu a développé une voie d'accès originale aux oxindoles en deux étapes *via* la réaction d'amidation de Buchwald-Hartwig effectuée sur un adduit de Ugi iodé (Schéma II.47).<sup>284</sup>



### II.6.3 Autres post-condensations

De manière générale, beaucoup d'autres types de séquence Ugi-réaction de condensation ou de cycloadditions sont possibles pour des adduits de Ugi savamment fonctionnalisés. Parmi celle-ci, on peut citer les tandems Ugi-Knoevenagel,<sup>285</sup> Ugi-Pictet-Spengler,<sup>286</sup> Ugi-Horner-Wadsworth-Emmons,<sup>287</sup> Ugi-condensation radicalaire (xanthate).<sup>288</sup> En utilisant le furfuraldéhyde comme aldéhyde de départ et une variété d'acide propargyliques, d'amines et d'isonitriles, le groupe de McCluskey a développé une voie d'accès originale aux tétrahydroépoxyisindolecarboxamides *via* la séquence Ugi-Diels-Alder (Schéma II.48).<sup>289</sup>

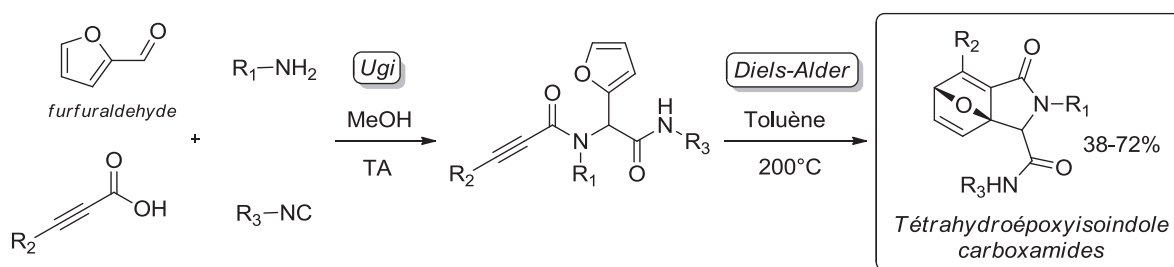


Schéma II.48. Synthèse de tétrahydroépoxyisindolecarboxamides *via* la séquence Ugi-Diels-Alder.

## III. RMC en Chimie Médicinale

Après avoir exploré les différentes stratégies synthétiques qu'offrent les réactions multicomposants dans le cadre de la synthèse dirigée vers la diversité, nous allons à présent donner, de façon non exhaustive, quelques exemples d'applications de ces principes en Chimie Médicinale. Enfin, nous ferons un état de l'art de leur emploi dans la recherche de traitements contre la maladie d'Alzheimer.<sup>290,291</sup>

### III.1 Inhibiteurs de protéases

Plusieurs protéases de différentes origines taxonomiques (humaine, parasitaire, virale ou bien encore bactérienne) constituent des cibles biologiques importantes pour l'industrie pharmaceutique.<sup>292,293</sup> De manière générale, les protéases clivent d'autres protéines en fragments plus petits pour servir dans divers processus biologiques. L'idée directrice est de concevoir des molécules non clivables analogues à l'état de transition créée lorsque l'enzyme

coupe son substrat endogène ou bien, mimant le pharmacophore principal du substrat. Les inhibiteurs de protéases contiennent souvent dans leur structure des motifs  $\alpha$ -cétocarboxamide, (nor)statine ou encore, acide hydroxamique facilement accessibles par RMC. Nous donnons ici l'exemple de la synthèse d'un intermédiaire pipérazine clé de l'indinavir (Crixivan®), un inhibiteur de la protéase HIV-1, *via* la réaction de Ugi.<sup>294</sup>

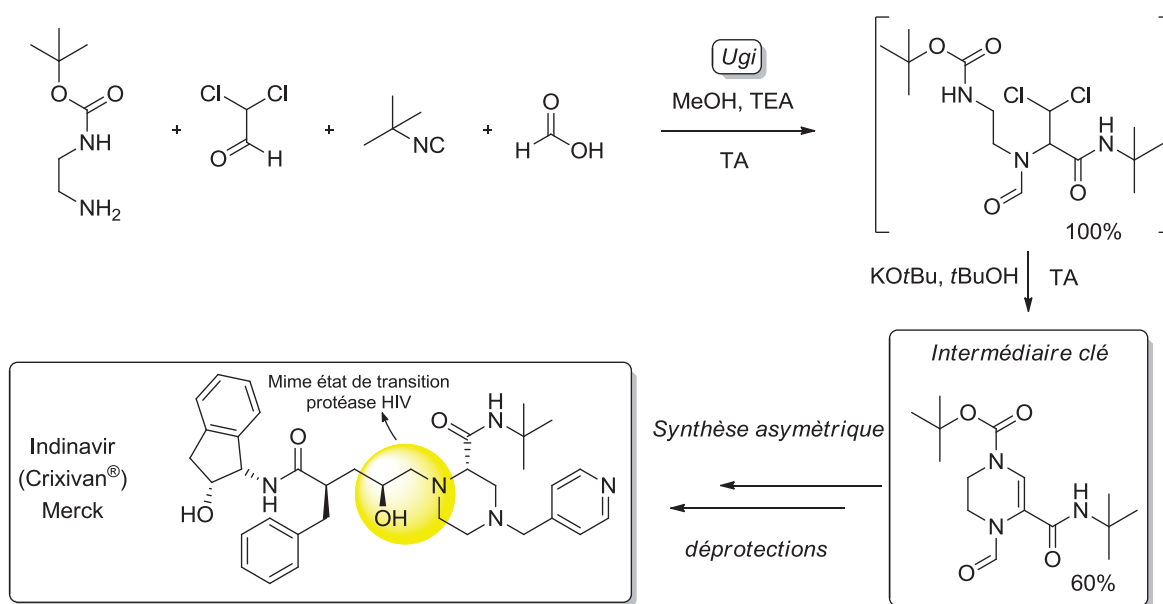


Schéma II.49. Synthèse d'un intermédiaire clé de l'indinavir *via* la réaction de Ugi.

### III.2 Inhibiteurs de kinases

Les kinases sont des cibles thérapeutiques très étudiées. Leur rôle principal est d'ajouter des groupements phosphates à des protéines cibles. Ces enzymes sont impliquées dans beaucoup de processus physiopathologiques tel que le cancer ou bien les maladies neurodégénératives.<sup>295</sup> Le schéma II.50 montre la synthèse de la molécule SB220055 assemblée *via* la réaction de Van Leusen. Ce composé est un inhibiteur de la kinase p38 et il est actuellement en phase III d'étude clinique pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde.<sup>296</sup>

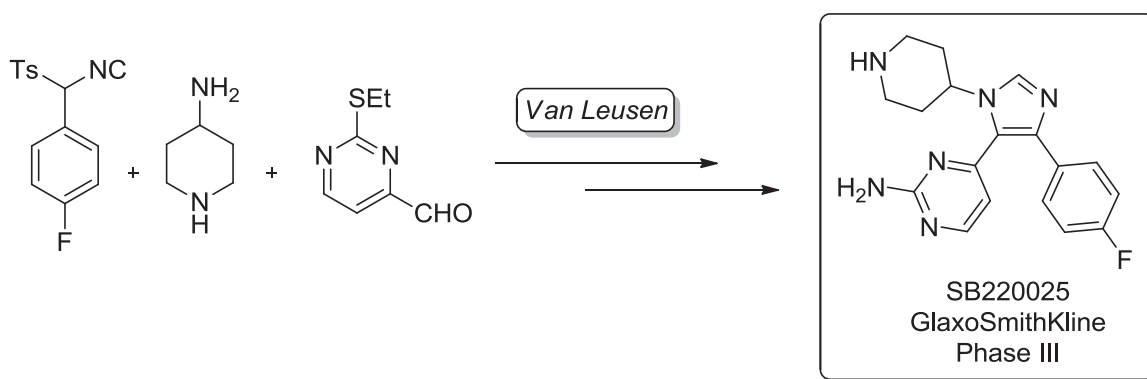


Schéma II.50. Synthèse du composé SB220055 *via* la réaction de Van Leusen.

### III.3 Modulateurs de récepteurs couplés aux protéines G

Les modulateurs des récepteurs couplés aux protéines G représentent actuellement 25% à 50% des molécules mises sur le marché.<sup>297,298</sup> Ces récepteurs permettent la transduction du signal, après modulation par leurs substrats endogènes respectifs, vers l'intérieur de la cellule. Le retosiban®, synthétisé *via* la stratégie UDC, est un antagoniste des récepteurs à l'ocytocine. Actuellement en phase II d'étude clinique, il est préconisé chez les femmes enceintes ayant un risque accru d'accoucher prématurément (Schéma II.51).<sup>299</sup>

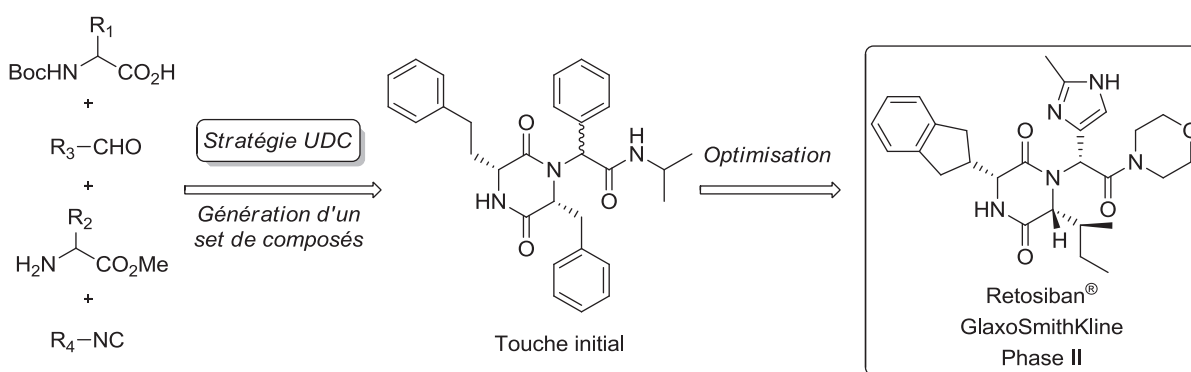


Schéma II.52. Elaboration du Retosiban®, antagoniste des récepteurs à l'ocytocine.

### III.4 L'approche multicomposants pour contrer la maladie d'Alzheimer

Nous avons vu que les RMC étaient des outils très performants pour générer de la diversité structurale en très peu d'étapes. Cette diversité peut être mise à profit dans le cadre de la maladie d'Alzheimer dont l'étiologie complexe peut être abordée par cette approche.



### III.4.1 Inhibiteurs de cholinestérases

Dans notre laboratoire, Tomassoli *et al.* ont préparé des hexahydropyrimido[5,4-c]quinoline-2,5-diones par la réaction de Biginelli suivi d'une réaction domino d'amination/ $S_NAr$  avec de l'ammoniaque. Ces composés se sont révélés être des inhibiteurs sélectifs de l'AChE mais aussi des antagonistes du canal du calcium voltage-dépendant (Schéma II.53).<sup>300</sup>

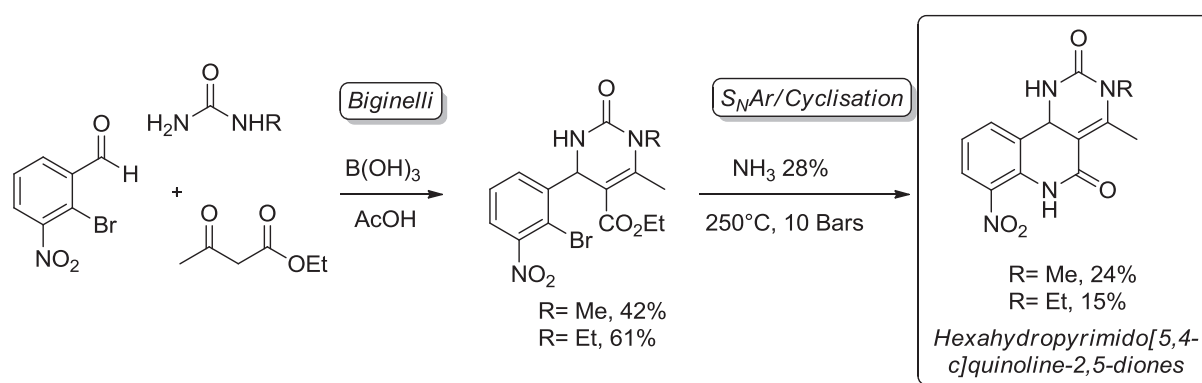


Schéma II.53. Synthèse d'hexahydropyrimido[5,4-c]quinoline-2,5-diones.

Arunkhamkaew *et al.* ont exploité la structure de la curcumine, un antioxydant puissant, pour développer l'accès à des analogues tétrahydrocurcuminoïdes dihydropyrimidones en utilisant la réaction de Biginelli. Ces composés se sont révélés être des inhibiteurs modérés de l'AChE. On peut noter l'absence des données relatives à l'évaluation de l'activité oxydante dans l'article (Schéma II.54).<sup>301</sup>

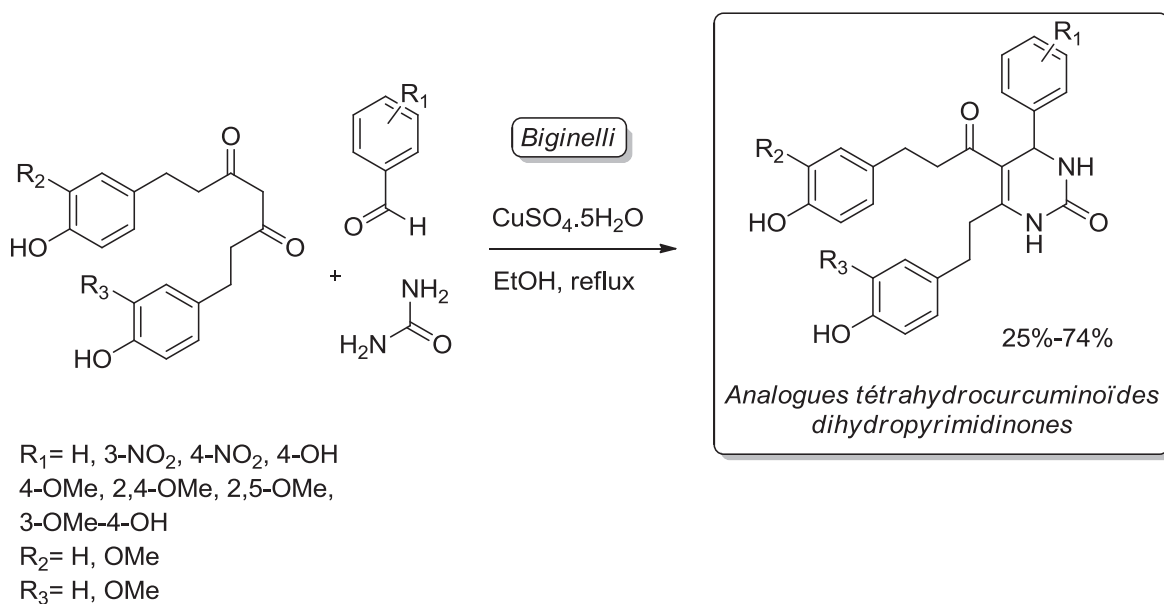


Schéma II.54. Synthèse d'analogues tétrahydrocurcuminoïdes dihydropyrimidinones.

L'application des principes de la Chimie Verte pour la synthèse de dérivés bioactifs est devenue cruciale pour une gestion raisonnée des flux de matières et un gain de productivité dans l'industrie du médicament ou dans le monde académique.<sup>302</sup>

Dans ce contexte, Basiri *et al.* ont préparé des pyridopyrimidine-2-thiones *via* une séquence domino -addition de Michael-condensation-tautomérisation- en utilisant l'activation par micro-ondes et un liquide ionique comme solvant réactionnel « vert ». Ces dérivés pyrimidine-2-thiones ont montrés de bonnes propriétés anticholinestérasiques (Schéma II.55).<sup>303</sup>

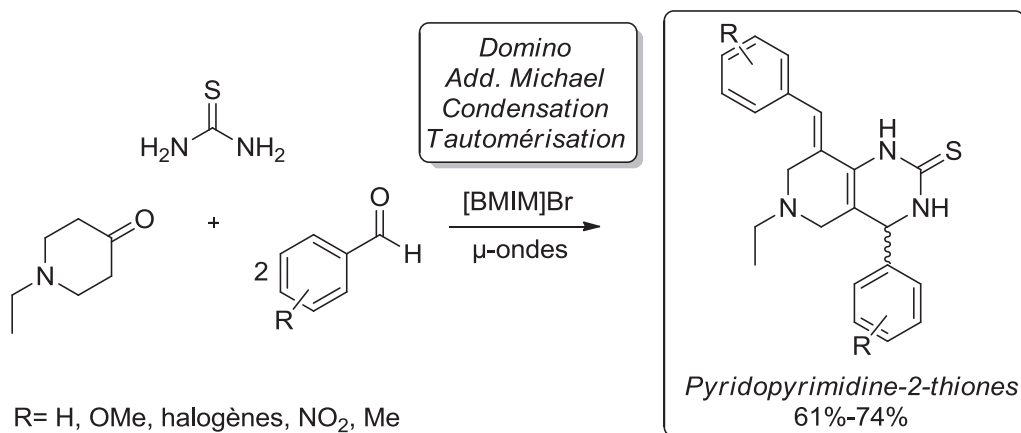


Schéma II.55. Synthèse de pyridopyrimidine-2-thiones sous conditions éco-compatibles.

Dickerson *et al.* ont été les premiers à développer une bibliothèque d'inhibiteurs de l'AChE en utilisant la réaction de Ugi. En se basant sur la modélisation moléculaire et sur des données expérimentales, cette équipe a identifié une série d' $\alpha$ -acylaminocarboxamides pouvant se fixer efficacement au PAS de l'AChE et ainsi interrompre les interactions entre l'AChE et le peptide A $\beta$ . Dickerson *et al.* ont utilisé un pharmacophore hydrophobe et plan basé sur un groupement naphthyle, appelé motif « carte de crédit », qui crée des interactions d'empilement  $\pi$ - $\pi$  avec les résidus hydrophobes présents dans le PAS et inhibant de fait l'agrégation du peptide A $\beta$ . Les auteurs ont également démontré que l'activité inhibitrice n'était pas seulement fonction de la présence du motif « carte de crédit » mais aussi fonction du squelette  $\alpha$ -acylaminocarboxamide. Ce squelette rencontré dans ces composés constitue le point de départ de notre stratégie pour la synthèse de nos propres adduits de Ugi comme nous le verrons au chapitre III (Schéma II.56).<sup>304</sup>

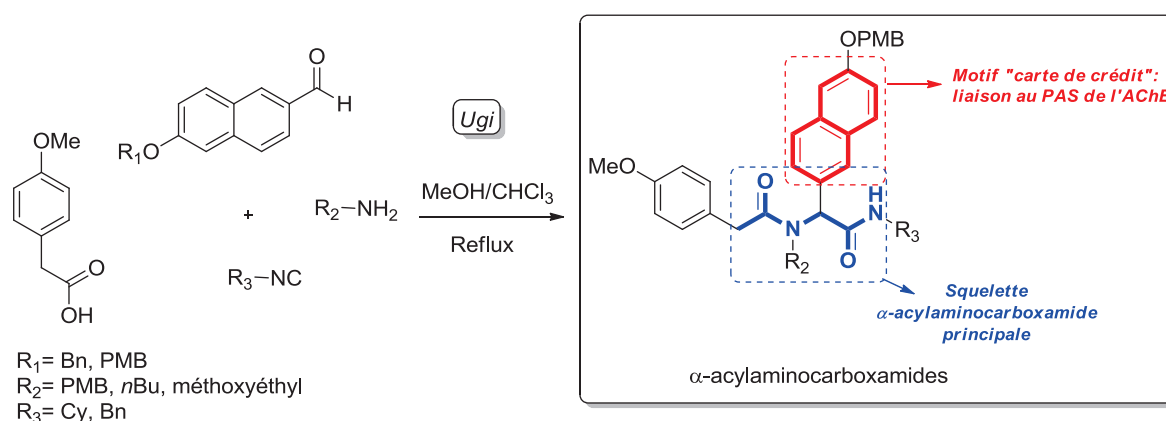


Schéma II.56. Synthèse de ligands du PAS de l'AChE.

Sokolova *et al.* ont développé une série de conjugués phosphonate-peptide inhibiteurs de sérine hydrolases (AChE, BuChE, carboxylestérase -CaE-), *via* la séquence Ugi-Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, présentant une sélectivité accrue en faveur de la BuChE et de la CaE. Les auteurs de la publication émettent l'hypothèse que cette sélectivité est due à l'incorporation d'un fragment peptidomimétique dans la structure du phosphonate (Schéma II.57). Cependant, les auteurs n'inscrivent pas concrètement ces composés dans le cadre la maladie d'Alzheimer.<sup>305</sup>

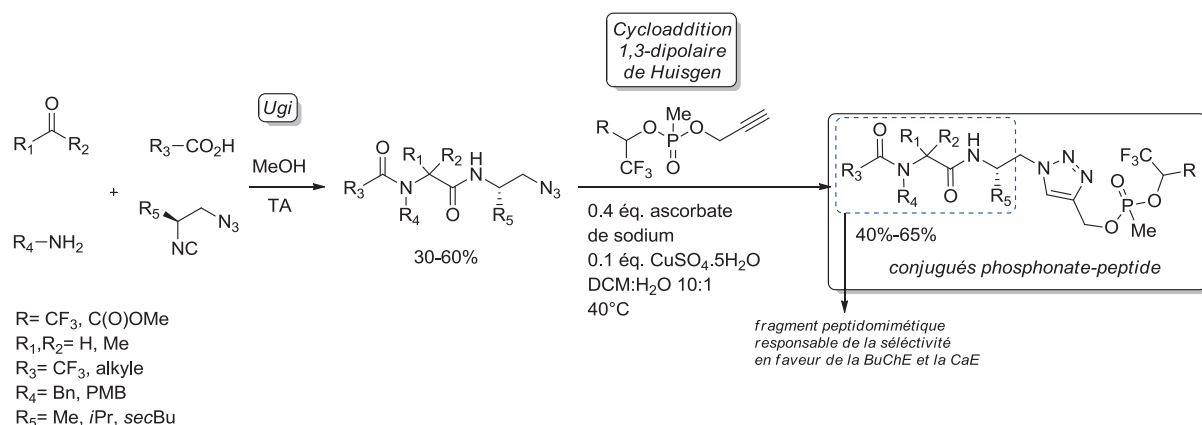


Schéma II.57. Synthèse de conjugués phosphonate-peptide.

La réaction de Povarov entre une énamine cyclique, un aldéhyde et une amine, a servi de point départ à Di Pietro *et al.* pour la préparation de tétrahydrobenzo[*h*][1,6]naphtyridines. Ces composés, inspirés de l'iodure de propidium, sont capables de se fixer au PAS de l'AChE comme le prouve la modélisation moléculaire de certains composés dans la structure RX de l'AChE (PDB ID: 3LII) (Schéma II.58).<sup>306</sup>

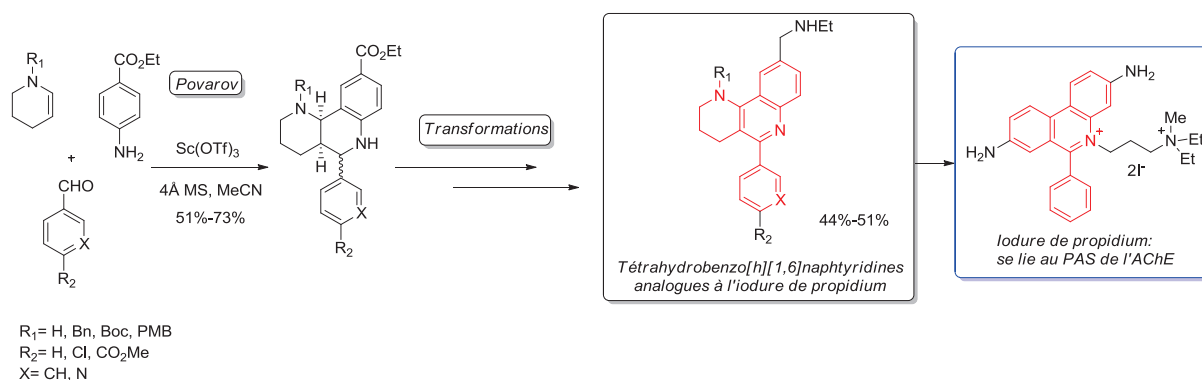


Schéma II.58. Synthèse de tétrahydrobenzo[*h*][1,6]naphtyridines.

Après s'être intéressé aux ligands du PAS de l'AChE, Di Pietro *et al.* ont complété le profil pharmacologique des tétrahydrobenzo[*h*][1,6]naphtyridines en formant des hybrides avec la 6-chlorotacrine. Ces nouveaux hybrides ont la capacité de se lier à la fois au CAS et au PAS de l'AChE (*dual-binding site inhibitors*) et d'inhiber l'agrégation des protéines tau et Aβ. De plus, des études de perméabilité effectuées sur un extrait lipidique de tissus cérébraux porcins

(test PAMPA-BBB) ont montré qu'ils pouvaient traverser efficacement la BHE (Schéma II.59).<sup>307</sup>

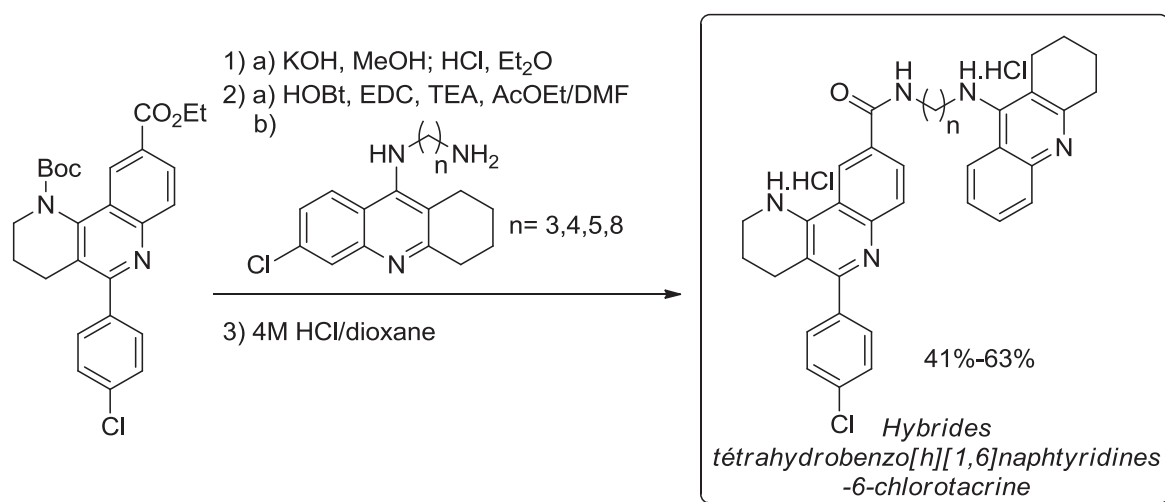


Schéma II.59. Synthèse des hybrides tétrahydrobenzo[h][1,6]naphtyridines-6-chlorotacrine.

Sobieski da Costa *et al.* ont développé une condensation à 4 composants impliquant différents linkers tacrine avec du benzile, différents benzaldéhydes substitués et de l'acétate d'ammonium en présence d'une quantité catalytique de chlorure d'indium. On forme ainsi *one-pot* des hybrides tacrine-lophine. Ces composés ont montré une bonne inhibition (de l'ordre du nanomolaire) des cholinestérases (Schéma II.60).<sup>308</sup>

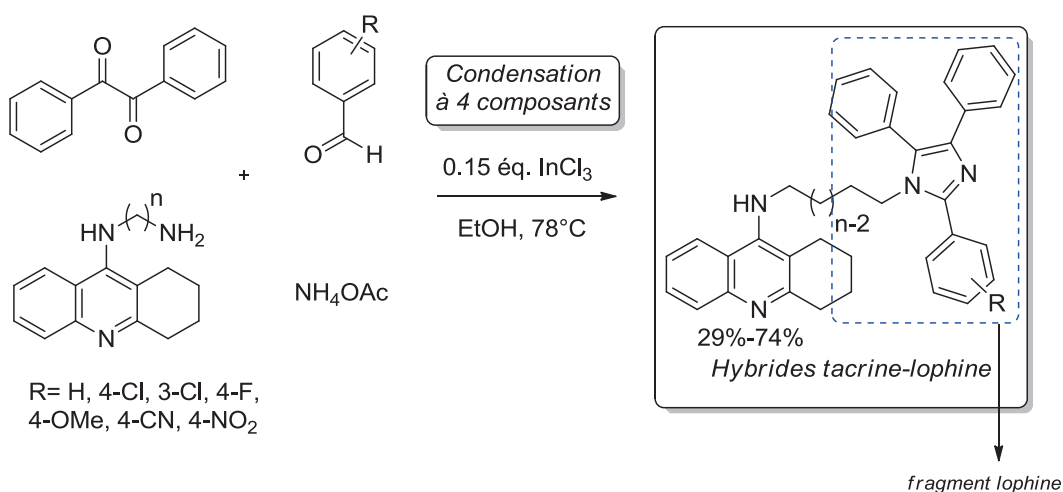
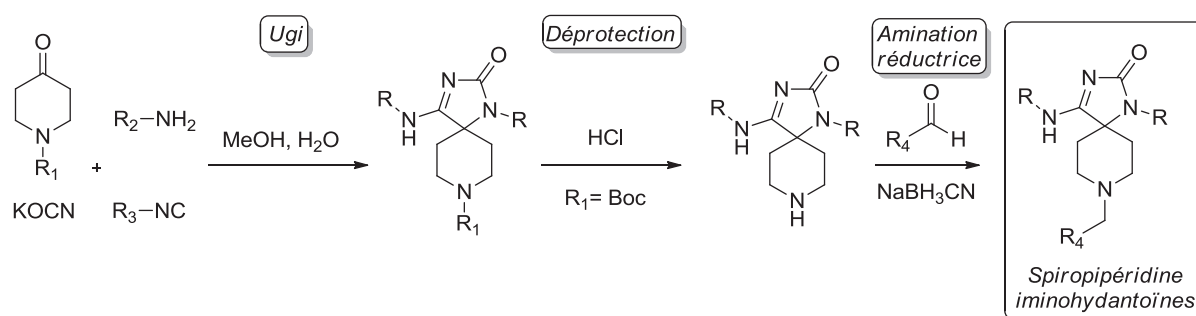


Schéma II.60. Synthèse d'hybrides tacrine-lophine.

### III.4.2 Inhibiteurs de la $\beta$ -sécrétase (BACE-1)

L'inhibition de la  $\beta$ -sécrétase constitue actuellement un axe de recherche important. Dans ce cadre, Barrow *et al.* ont utilisé une variation de la réaction de Ugi pour développer l'accès à des spiropipéridines iminohydantoïnes à partir du cyanate de potassium, une 4-pipéridine-4-one et un isonitrile.<sup>309</sup> Ces composés se sont révélés être de bons inhibiteurs de BACE-1 (Schéma II.61).



## IV. Conclusion sur le chapitre II

Nous avons débattu, au cours de ce chapitre, de l'immense potentiel synthétique offert par les réactions multicomposants et leurs nombreuses applications en Chimie Médicinale ; plus particulièrement, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Dans le chapitre suivant, nous exposerons nos travaux de thèse qui consistent en la synthèse multicomposants de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini possédant un profil polypharmacologique sur plusieurs cibles d'intérêt impliquées dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer.



# CHAPITRE III

## Travaux personnels





## I. Introduction

L'idée directrice reliée à la conception de nos molécules réside dans le mariage de la stratégie multi-cibles comme nous avons pu en discuter au chapitre I avec les réactions multicomposants de Ugi et de Passerini vues au chapitre II, Ainsi, tout au long de ce chapitre, nous discuterons des synthèses et des évaluations biologiques et physico-chimiques de nos adduits de Ugi et de Passerini dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Schéma III.1).

Dans un premier temps, nous détaillerons de la synthèse et de l'évaluation biologique préliminaire de la série **A**, constituée d'adduits prototypes de Ugi.

Dans un second temps, nous exposerons et étudierons la synthèse et l'évaluation pharmacologique des séries **B**, **C** et **D** constituées d'un squelette principal  $\alpha$ -acylaminocarboxamide (Ugi), possédant différents motifs tacrine ou *N*-benzylpipéridine et de la série **E**, possédant un motif chromone greffé sur un châssis  $\alpha$ -acyloxycarboxamide (Passerini).

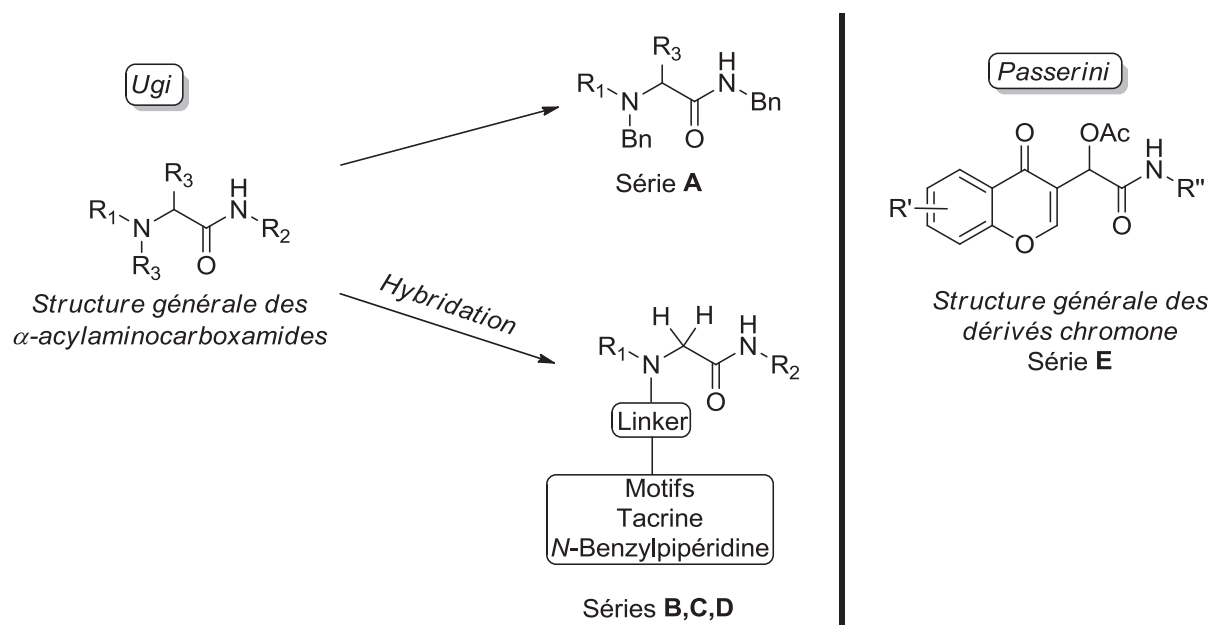


Schéma III.1. Les séries synthétisées et évaluées.

## II. $\alpha$ -acylaminocarboxamides prototypes (série A)

### II.1 Synthèse

De manière exploratoire, nous nous sommes inspirés des travaux de Dickerson *et al.* sur l'utilisation de la réaction de Ugi dans le cadre de la maladie d'Alzheimer pour la synthèse de nouveaux adduits prototypes de Ugi.<sup>304</sup> Ces derniers sont basés sur la présence un groupement aromatique plan dans la structure  $\alpha$ -acylaminocarboxamide et la principale modification est l'introduction de fragments antioxydants comme les acides férulique, caféique ou lipoïque.

Ainsi, la réaction de ces acides avec différents aldéhydes aromatiques, la benzylamine et l'isocyanure de benzyle dans le méthanol à TA pendant 24h, a fourni 13 composés **A1-A13** avec des rendements variant entre 10% et 77%. Nous avons constaté expérimentalement que l'étape de pré-formation de l'imine, par condensation de l'amine sur l'aldéhyde, était déterminante pour initier la réaction.<sup>310</sup> Pour pouvoir étudier l'effet du fragment aromatique  $R_3$ , nous avons également synthétisé les composés **A1** et **A11** avec un méthylène en position  $R_3$  (Schéma III.2).

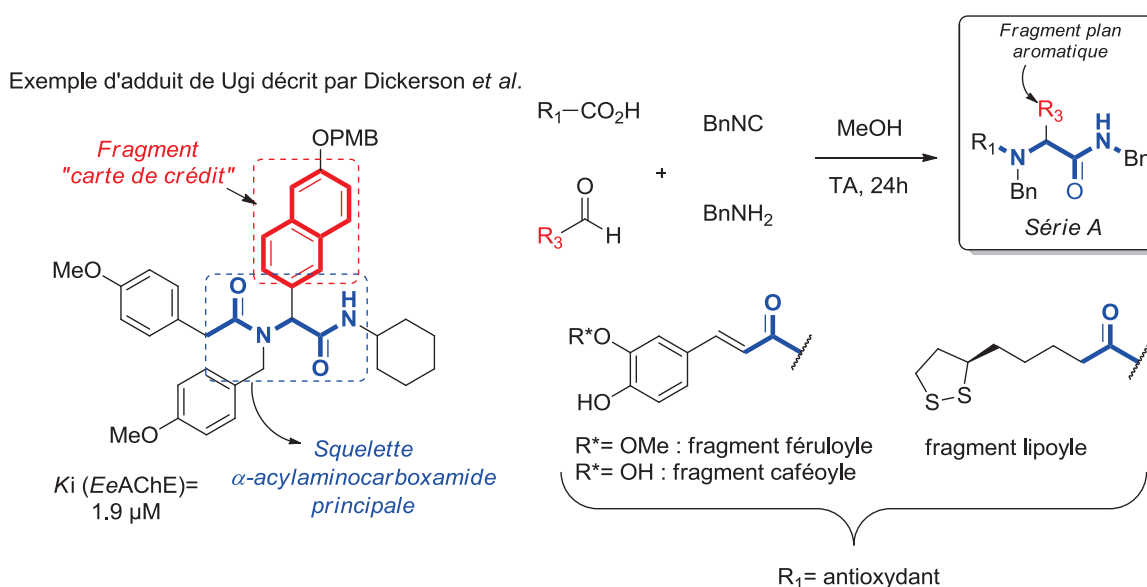


Schéma III.2. Synthèse des  $\alpha$ -acylaminocarboxamides prototypes (Série A).

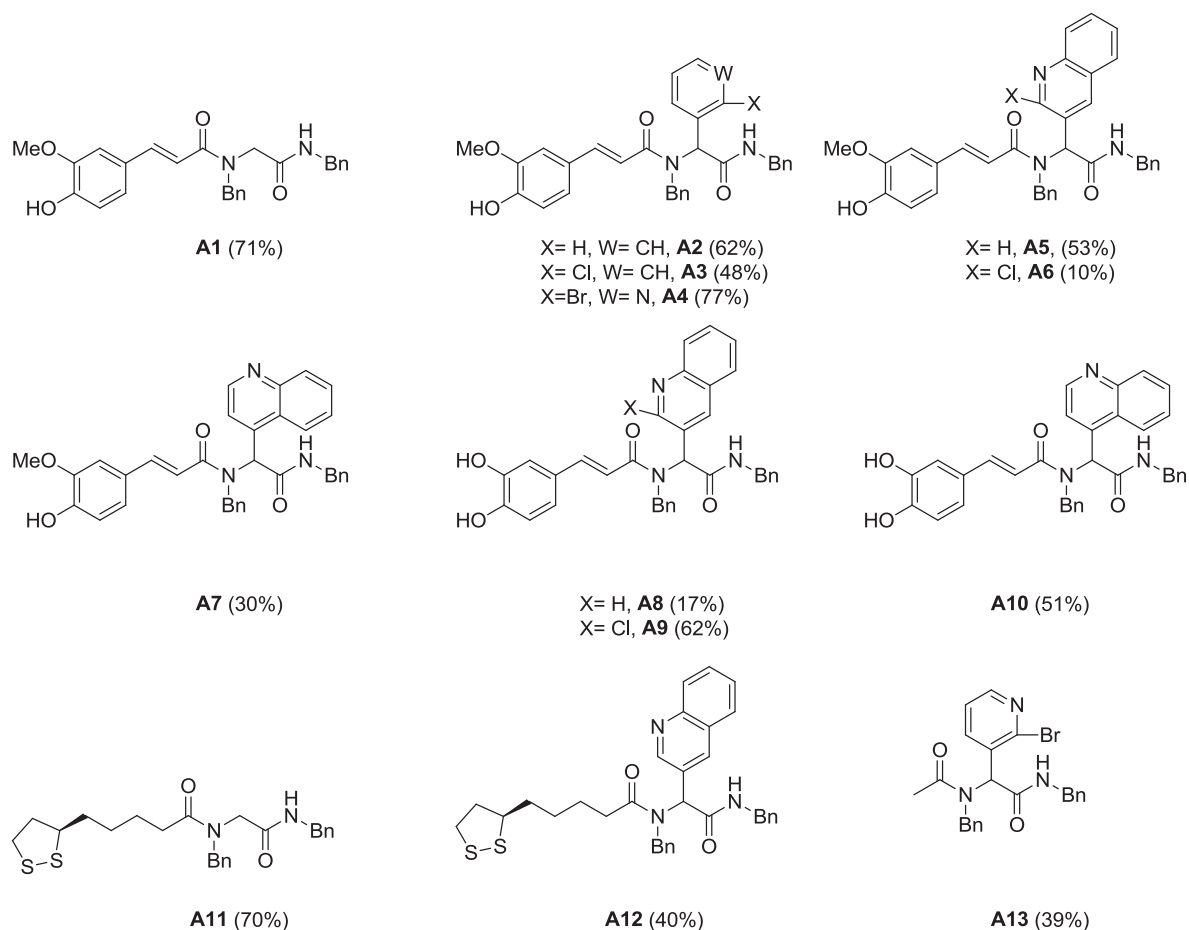


Schéma III.2 (suite). Synthèse des  $\alpha$ -acylamino carboxamides prototypes, les rendements sont entre parenthèses.

A l'instar des composés « carte de crédit » de Dickerson *et al.*, nous avons émis l'hypothèse que la présence d'un fragment aromatique plan dans la structure  $\alpha$ -acylamino carboxamide tel que le benzaldéhyde, d'un de ces dérivés ou d'une quinolinecarboxaldehyde, pourrait potentiellement inhiber les cholinestérases. Nous obtiendrions alors des adduits capables à la fois d'inhiber les cholinestérases et possédant des propriétés antioxydantes.

## II.2 Evaluation de l'inhibition des cholinestérases

Nous avons utilisé pour l'évaluation de la série **A** de l'acétylcholinestérase issue d'anguille électrique (*Electricus electrophorus* AChE, EeAChE) et de la butyrylcholinestérase extraite de sérum de cheval (equine BuChE, eqBuChE). Ces enzymes de source animale sont

structuellement proche des cholinestérases d'origine humaine (hAChE, hBuChE) et leur faible coût d'utilisation les rend adaptées pour des tests préliminaires.

### II.2.1 Le test d'Ellman

Le test d'Ellman permet de déterminer le potentiel inhibiteur d'un composé sur les cholinestérases (AChE et BuChE).<sup>311</sup> Ce potentiel peut être le pourcentage d'inhibition à une concentration donnée ou la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique (*half maximal inhibitory concentration*,  $IC_{50}$ ) donnée par une courbe sigmoïdale de dosage.

#### II.2.1.1 Acetylcholinestérase

L'acétylthiocholine est habituellement utilisé comme substrat artificiel de l'AChE dont l'hydrolyse conduit à la formation de thiocholine. Celle-ci réagit par la suite avec le DTNB [acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)], présent dans le milieu réactionnel, dont le clivage du pont disulfure présent dans sa structure permet de libérer l'anion 3-carboxy-4-nitrobenzénethiolate de couleur jaune. Ce dernier devient alors détectable par spectrophotométrie UV à 412 nm (Schéma III.3).

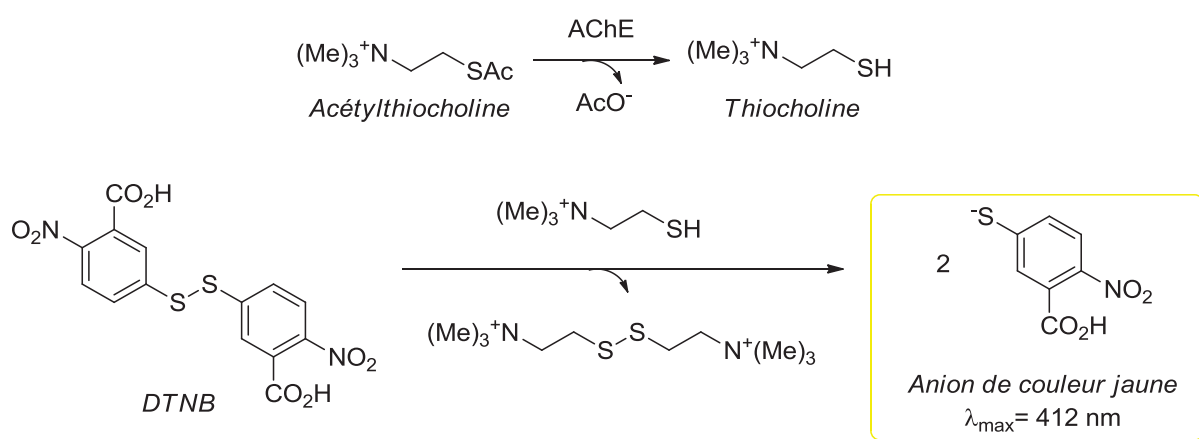


Schéma III.3. Test d'Ellman avec l'AChE.

### II.2.1.2 Butyrylcholinestérase

Le principe du test reste le même pour la BuChE sauf que l'on utilise de la butyrylthiocholine à la place de l'acétylthiocholine (Schéma III.4).

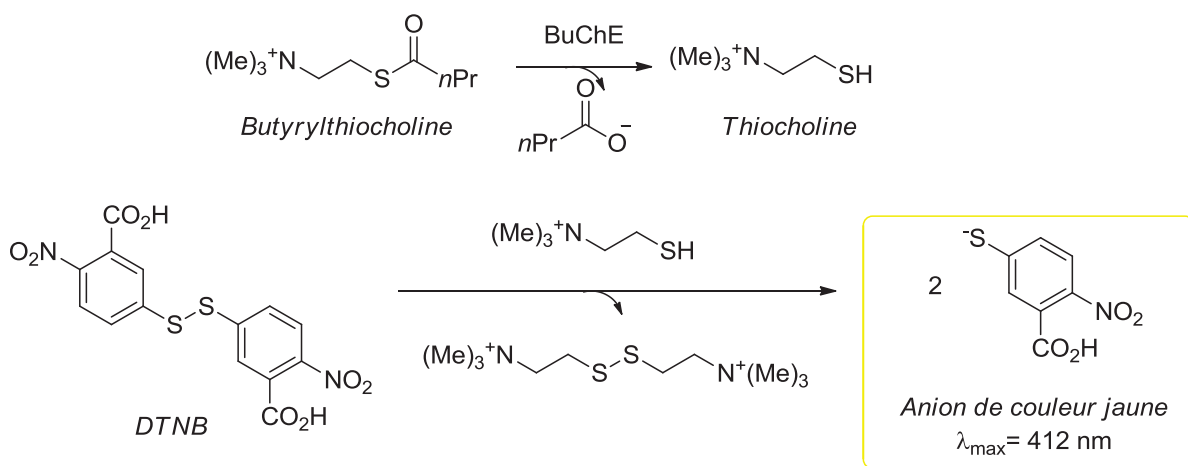


Schéma III.4. Test d'Ellman avec la BuChE.

### II.2.2 Résultats

Le tableau III.1 regroupe les résultats d'inhibition de la série **A** sur l'EeAChE et la eqBuChE à la concentration de 1  $\mu\text{M}$ . Nous n'avons pas été en mesure de déterminer d'IC<sub>50</sub> pour les composés présentant des pourcentages d'inhibition supérieur à 50% car les adduits précipitent au-delà de 1  $\mu\text{M}$ . La tacrine est prise comme référence.

Tableau III.1. Résultats d'inhibition de la série **A** sur l'*EeAChE* et la *eqBuChE*.

Composés	<i>EeAChE</i>			<i>eqBuChE</i>		
	10 $\mu\text{M}^a$	1 $\mu\text{M}^a$	IC <sub>50</sub> (nM)	10 $\mu\text{M}^a$	1 $\mu\text{M}^a$	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>A1</b>	insoluble	51.5%±2.7	-	insoluble	71.0%±8.6	-
<b>A2</b>	insoluble	41.2%±4.4	-	insoluble	58.9%±7.6	-
<b>A3</b>	insoluble	4.3%±0.7	-	insoluble	23.0%±1.8	-
<b>A4</b>	non testé	non testé	-	non testé	non testé	-
<b>A5</b>	insoluble	1.2%±0.9	-	insoluble	17.0%±0.2	-
<b>A6</b>	insoluble	19.5%±0.9	-	insoluble	2.7%±2.2	-
<b>A7</b>	insoluble	44.5%±0.6	-	insoluble	63.2%±3.8	-
<b>A8</b>	insoluble	0.8%±0.7	-	insoluble	- <sup>b</sup>	-
<b>A9</b>	insoluble	3.1%±2.5	-	insoluble	1.6%±1.3	-
<b>A10</b>	insoluble	insoluble	-	insoluble	insoluble	-
<b>A11</b>	insoluble	28.6%±0.3	-	insoluble	26.3%±5.3	-
<b>A12</b>	insoluble	37.2%±3.3	-	insoluble	51.9%±6.4	-
<b>A13</b>	non testé	non testé	-	non testé	non testé	-
<b>Tacrine</b>	-	100%	44.30±1.54 <sup>c</sup>	-	100%	5.07±0.19 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Pourcentages exprimés par la moyenne ± SEM de trois essais indépendants effectués en quadruplicat. <sup>b</sup>Pas actif. <sup>c</sup>Les courbes d'inhibitions de la tacrine ont été obtenues par régression non linéaire. L'IC<sub>50</sub> est la moyenne ± SEM de quadruplicat d'au moins 3 différentes expériences.

Nous constatons tout d'abord que les composés **A1**, **A2**, **A3**, **A5**, **A7** et **A12** inhibe la *eqBuChE* avec des pourcentages d'inhibition allant de 51.9% à 71.0%. Dans la série **A1-A7** portant un motif féruloyle, les meilleurs pourcentages d'inhibition des cholinestérases sont obtenus pour le composé **A1** avec R<sub>3</sub>= méthylène. Concernant les composés **A8-A10** possédant un fragment caféoyle, nous constatons qu'ils ne sont pas actifs jusqu'à leur limite de solubilité. En revanche, nous pouvons voir que les pourcentages d'inhibition des cholinestérases (*EeAChE*= 28.6%, *eqBuChE*= 26.3%) diminuent pour le composé **A11** possédant un motif méthylène, en comparaison avec l'adduit analogue **A12** avec un motif quinoléine (*EeAChE*= 37.2%, *eqBuChE*= 51.9%).

Ainsi, expérimentalement, les valeurs d'inhibitions obtenues sont modestes mais ces résultats préliminaires permettent néanmoins d'envisager d'autres modifications de structure en prenant comme socle commun le cœur  $\alpha$ -acylaminocarboxamide. Dans nos composés et d'après les pourcentages d'inhibition obtenus notamment pour le composé **A1** (*EeAChE*= 51.5 %, *eqBuChE*= 71.0 % à 1  $\mu\text{M}$ ), il est intéressant de noter que la présence d'un groupement R<sub>3</sub> aromatique plan n'influence pas nécessairement l'activité anticholinestérasique.

## II.3 Evaluation de la capacité antioxydante

L'évaluation de la capacité antioxydante de la série **A** a été réalisée grâce au test DPPH.

### II.3.1 Le test DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre stabilisé par mésomérie qui possède un électron libre sur l'atome d'azote. C'est un réactif largement utilisé pour déterminer les propriétés antioxydantes de phénols, catéchols et anilines.<sup>312</sup>

De coloration pourpre sous forme de radical ( $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$ ), le DPPH se décolore progressivement en présence d'un antioxydant en captant un atome d'hydrogène. Dans ce test, nous mesurons l'absorbance initiale du DPPH ( $A_{\text{contrôle}}$ ) et l'absorbance lorsque que l'on ajoute l'antioxydant ( $A_{\text{antiox}}$ ). La réduction de l'absorbance à 570 nm est une mesure du DPPH resté libre due à l'action de l'antioxydant. Nous pouvons ainsi déterminer l'activité antioxydante de nos composés [*Radical Scavenging Activity*, %RSA=  $(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{antiox}})/A_{\text{contrôle}} \times 100$ ]. L'acide férulique, caféique et lipoïque sont pris comme références (Schéma III.5).

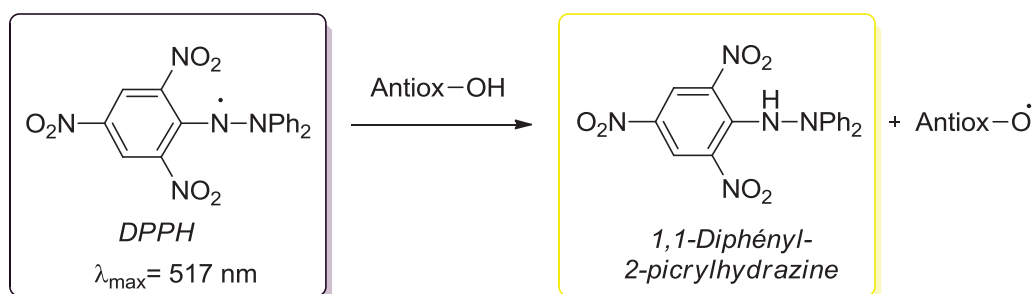


Schéma III.5. Réaction d'un antioxydant avec le DPPH.

### II.3.2 Résultats

Le tableau III.2 ci-dessous regroupe les pourcentages d'activité antioxydante de la série A à une concentration de 200  $\mu\text{M}$ .



Tableau III.2. Pourcentages d'activité antioxydante (%RSA) à 200  $\mu$ M.<sup>a</sup>

Composé	%RSA à 200 $\mu$ M	Composé	%RSA à 200 $\mu$ M
<b>A1</b>	29.5 $\pm$ 3.7	<b>A8</b>	89.1 $\pm$ 0.2
<b>A2</b>	25.1 $\pm$ 4.5	<b>A9</b>	85.2 $\pm$ 0.4
<b>A3</b>	22.8 $\pm$ 3.8	<b>A10</b>	77.9 $\pm$ 1.0
<b>A4</b>	non testé	<b>A11</b>	7.4 $\pm$ 5.7
<b>A5</b>	21.9 $\pm$ 4.0	<b>A12</b>	7.7 $\pm$ 4.1
<b>A6</b>	29.5 $\pm$ 3.0	<b>A13</b>	non testé
<b>A7</b>	28.3 $\pm$ 3.4	<b>Ac. caféique</b>	58.4 $\pm$ 3.2
<b>Ac. férulique</b>	37.7 $\pm$ 3.6	<b>Ac. Lipoïque</b>	9.0 $\pm$ 5.4

<sup>a</sup>Moyenne de trois essais consécutifs  $\pm$  SD.

Trois tendances se dégagent de ces résultats en relation avec les motifs antioxydants que l'on retrouve dans la série **A** (féruloyle, caféoyle et lipoyle). Nous pouvons tout d'abord constater que les composés **A1-A7** possédant le motif féruloyle ont une activité légèrement inférieure à celle de l'acide férulique. Concernant le motif caféoyle, nous remarquons que les composés **A8-A10** ont une activité antioxydante bien supérieure à l'acide caféique. Enfin, sans surprise, nous obtenons de faibles valeurs d'activité antioxydante pour les composés **A11-A12** possédant le motif lipoyle et l'acide lipoïque.

#### II.4 Conclusions sur la série A

Au travers de la série **A** nous avons pu, d'une part, nous familiariser avec la préparation des adduits de Ugi et d'autre part, évaluer de manière préliminaire leurs activité anticholinestérasique et antioxydante.

Nous avons ainsi identifié le composé **A1** (*EeAChE* : 51.5%, *eqBuChE* : 71.0%, Schéma III.6) comme structure clé pouvant servir par la suite de point de départ pour la synthèse d'hybrides possédant des fragments notamment connus pour leur action d'inhibition des cholinestérasés comme les motifs tacrine ou *N*-benzylpipéridine (séries **B**, **C**, **D**). Enfin, le test DPPH nous a donné une idée de la capacité antioxydante pour cette série. Les meilleurs antioxydants étant ceux possédant un motif caféoyle (**A8-A10**). Toutefois, les inhibitions des cholinestérasés sont faibles, voire nulles. Le meilleur compromis entre activité inhibitrice et capacité antioxydante est le choix du motif féruloyle (Schéma III.6).

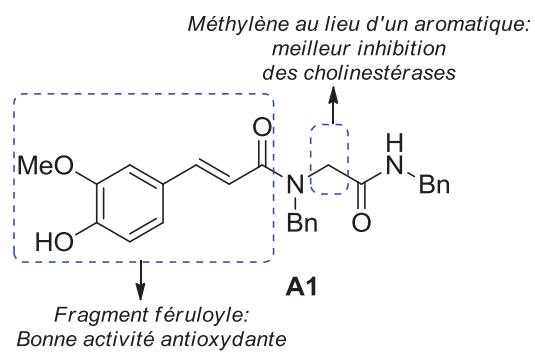


Schéma III.6. Structure du composé **A1**.

### III. Les différentes classes d'hybrides

Nous discuterons dans cette partie de la synthèse des différentes classes d'hybrides ainsi que de leurs évaluations pharmacologiques, toxicologiques et physico-chimiques.

Ces adduits sont (Schéma III.7) :

- Les hybrides tacrine-acide férulique (**série B**)
- Les hétérotrimères tacrine-mélatonine-acides antioxydant (**série C**)
- Les hybrides acide-férulique-N-benzylpipéridine (**série D**)
- Les dérivés chromone (**série E**)

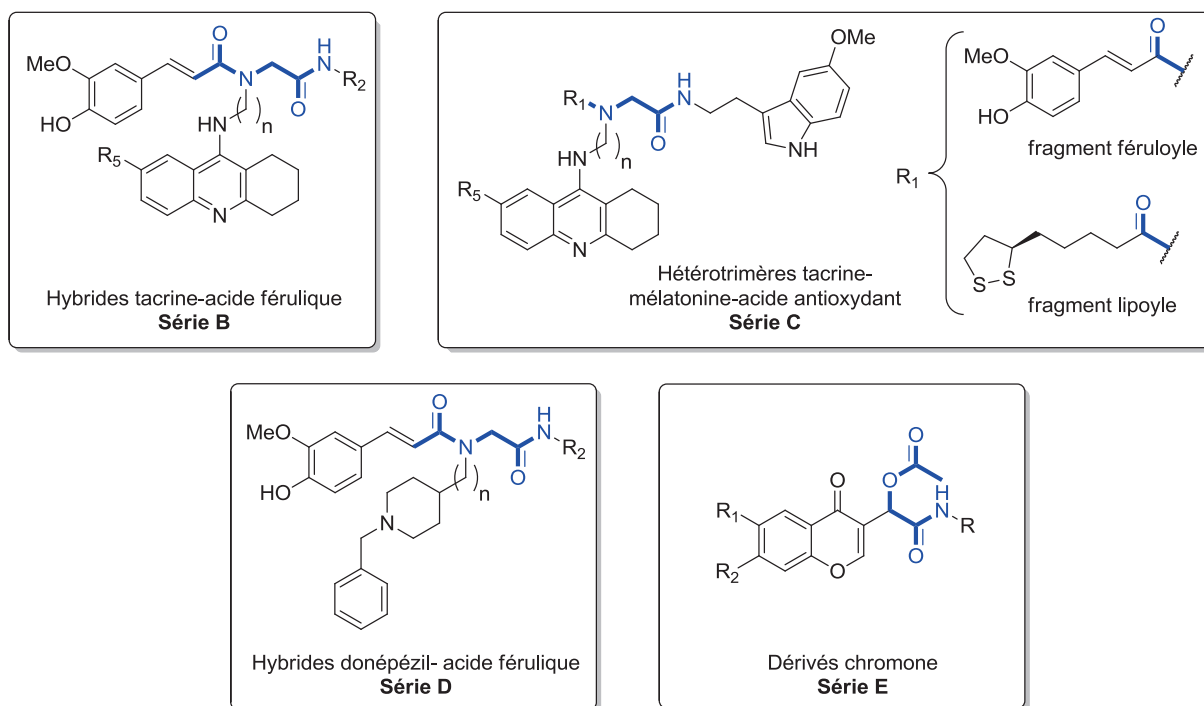


Schéma III.7. Les différentes classes d'hybrides préparés et évalués.

### III.1 Préparations des précurseurs

#### III.1.1 Synthèse des linkers tacrine

La réaction de l'acide anthranilique avec la cyclohexanone fournit la spiro[2*H*-3,1-benzoxazine-2,1-cyclohexan]-4(1*H*)-one **1a**, qui après traitement avec l'oxychlorure de phosphore donne la 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine **2a**. La 7-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydroacridin-9(10*H*)-one **1b** a été préparé en faisant réagir la *p*-anisidine avec la 2-éthoxycarbonylcyclohexanone, en présence d'une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique monohydraté (APTS). Le traitement du composé **1b** avec l'oxychlorure de phosphore donne la 9-chloro-7-méthoxy-1,2,3,4-tétrahydroacridine **2b**. Ensuite la réaction des intermédiaires **2a** et **2b** avec les différents 1,*n*-diaminoalcanes commerciaux (*n* = 5, 6, 7, 8, 9) dans le 1-pentanol à reflux pendant 18 heures, produit les composés **3a-h** avec un rendement allant de 54% à 66% (Schéma III.8).<sup>313,314</sup>

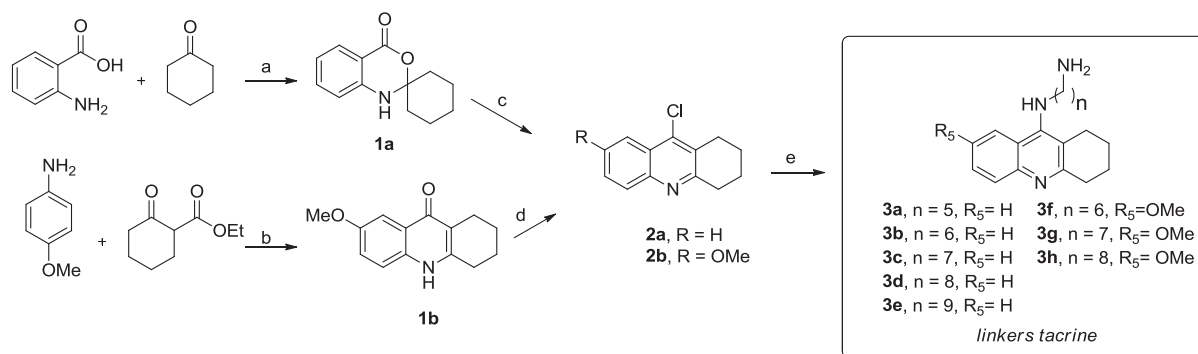


Schéma III.8. Synthèse des linkers tacrine **3a-h**. (a) toluène, reflux, (61%); (b) toluène, *p*-TsOH.H<sub>2</sub>O (12 mol%), reflux, 8 h, (75%); (c) POCl<sub>3</sub> (4.2 éq.), reflux, 1 h (93%); (d) POCl<sub>3</sub> (14.6 éq.), reflux, 1 h (56%); (e) NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>*n*</sub>NH<sub>2</sub> (3.0 éq.), 1-pentanol, reflux, 18 h (54-66%).

#### III.1.2 Synthèse des isonitriles

Différents isonitriles ont été synthétisés pour servir de substrats de départ dans les réactions de Ugi et de Passerini.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la synthèse du 3-(2-isocyanoethyl)-5-méthoxy-1*H*-indole **5**, pour pouvoir introduire un fragment mélatonine antioxydant dans nos hybrides (séries **C** et **D**).

Le *N*-formamide **4** a été synthétisé avec un rendement de 59% à partir de la réaction de la 5-méthoxytryptamine commerciale et d'un large excès de formiate d'éthyle à température ambiante pendant 5 jours (Schéma III.9).

Le *N*-formamide **4** en main, différentes conditions de déshydratation ont été testées (Schéma III.9 et Tableau III.3). Nous avons utilisé dans le premier essai (entrée 1, Tableau III.3) les conditions classiques de déshydratation utilisant l'oxychlorure de phosphore avec de la triéthylamine, cependant, l'isonitrile **5** n'a pas pu être isolé et nous obtenons un mélange complexe. Par la suite, nous nous sommes intéressés au sulfurane de Martin (entrée 2, Tableau III.3). Ce réactif est, entre autre, connu dans la littérature pour déshydrater des alcools en alcènes de manière douce.<sup>315</sup> Néanmoins, lors de la mise en œuvre de la réaction, aucun indice de la présence de l'isonitrile **5** n'a pu être décelé ni en CCM ni en RMN <sup>1</sup>H. Enfin, nous avons testé la méthode de déshydratation décrite par Creedon *et al.* utilisant le réactif de Burgess (entrée 3) et avons obtenu l'isonitrile **5** avec un rendement de 69%. Le réactif de Burgess étant hygroscopique, un léger excès est utilisé.<sup>222</sup>

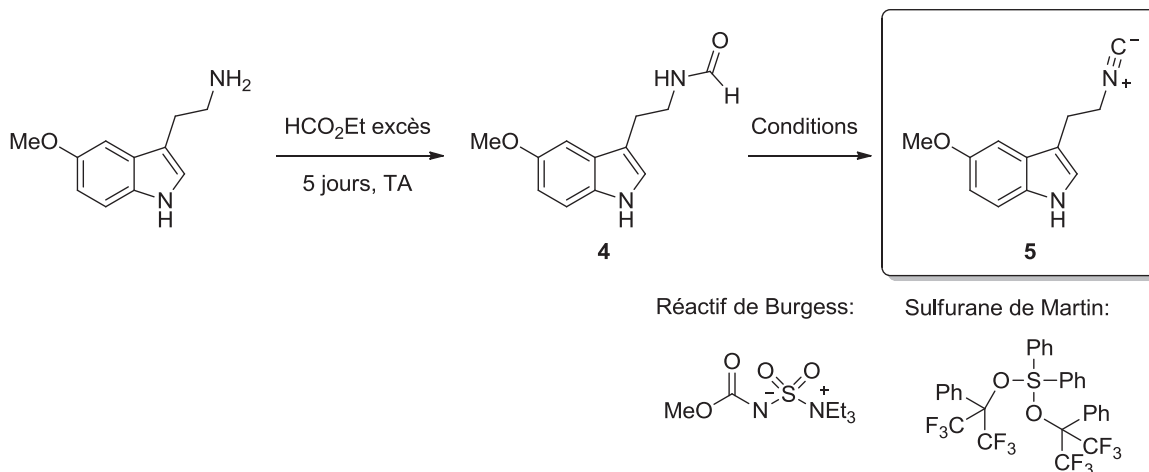
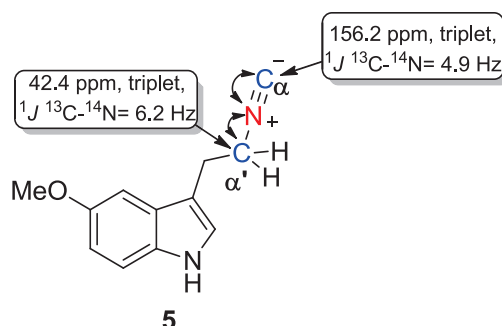


Schéma III.9. Synthèse du 3-(2-isocyanoéthyl)-5-méthoxy-1*H*-indole **5**.

Tableau III.3. Conditions testés pour la synthèse du composé **5**.

Entrée	Conditions	Résultat
1	1 éq. POCl <sub>3</sub> /3 éq. TEA/DCM/0°C/1h	Mélange complexe
2	1 éq. Sulfurane de Martin/DCM/TA/1h	Pas de réaction
3	1.5 éq. Réactif de Burgess/DCM/reflux/1h	69%

L'isonitrile **5** a été caractérisé par spectrophotométrie infrarouge (FT-IR) et RMN <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C. En FT-IR, nous constatons la présence d'une bande d'absorption intense à 2148 cm<sup>-1</sup>, caractéristique de la fonction isonitrile. Concernant la RMN, le spectre JMOD <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) nous apporte des informations cruciales sur la structure du composé **5**. Deux signaux sont particulièrement intéressants, il s'agit des signaux des atomes de carbone C $\alpha$  (156.2 ppm) et C $\alpha'$  (42.4 ppm). A cause de la distribution symétrique des électrons autour de l'atome d'azote hybridé sp, les couplages <sup>13</sup>C $\alpha$ -<sup>14</sup>N et <sup>13</sup>C $\alpha'$ -<sup>14</sup>N peuvent être observés, cela conduit à des triplets d'intensité 1 : 1 : 1 que nous visualisons clairement sur le spectre <sup>13</sup>C de l'isonitrile **5** (spin de <sup>14</sup>N : 1, abondance naturelle : 99.6 %) (Schéma III.10).<sup>316</sup>

Schéma III.10. Signaux RMN <sup>13</sup>C (en ppm) des atomes C $\alpha$  et C $\alpha'$  de l'isonitrile **5**.

Par la suite, la réaction de la 1-benzylpipéridin-4-amine (n= 0) ou de la 2-(1-benzylpipéridin-4-yl)éthanamine (n= 2) (amines commerciales) avec un excès de formiate d'éthyle au reflux pendant 2 heures fournit, avec des rendements quantitatifs, les *N*-formamides **6a-b**.

La méthode de déshydratation avec le réactif de Burgess sur les composés **6a-b**, expérimenté pour la synthèse de l'isonitrile **5**, nous a permis d'isoler ensuite les isonitriles **7a-b** avec respectivement des rendements de 40% et 34%. Les spectres FT-IR et RMN  $^{13}\text{C}$  JMOD (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298K) confirment sans ambiguïté leurs structures. En FT-IR, nous visualisons clairement les bandes d'absorption du groupement isonitrile (composé **7a** :  $\nu_{\text{max}} = 2138 \text{ cm}^{-1}$ , composé **7b** :  $\nu_{\text{max}} = 2146 \text{ cm}^{-1}$ ). En RMN  $^{13}\text{C}$  JMOD, nous remarquons la présence des signaux correspondant aux atomes de carbone  $\text{C}\alpha$  et  $\text{C}\alpha'$ . Cependant, nous notons que l'atome  $\text{C}\alpha$  dans les deux isonitriles relaxe très lentement, menant à des pics en  $^{13}\text{C}$  très peu intenses. (Schéma III.11).

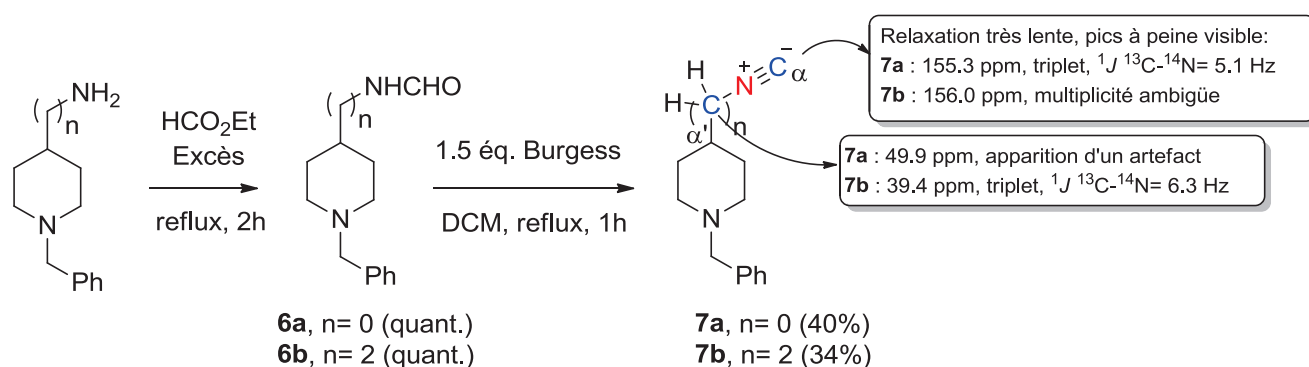


Schéma III.11. Synthèse des isonitriles **7a-b**.

En conclusion, nous avons synthétisé trois isonitriles, **5**, **7a-b**, pouvant servir de fragments potentiellement bioactives pour la synthèse de nos différents adduits de Ugi et de Passerini.

## III.2 Etude des hybrides tacrine-acide férulique (série B)

### III.2.1 Introduction

A la suite des premiers résultats encourageants obtenus pour la série **A** et afin de tirer profit de la diversité chimique accessible grâce à la réaction de Ugi, nous avons développé l'accès à de nouveaux hybrides tacrine-acide férulique (série **B**).

Ces nouvelles molécules font la synthèse entre l'approche MTDLs tel que Fang *et al.*<sup>172</sup> l'ont appliqué pour la préparation de leurs propres hybrides tacrine-acide férulique et l'approche multicomposants tel que nous l'avons exposé pour l'étude de la série **A** inspirés des adduits de Dickerson *et al.*<sup>304</sup> (cf. Chap. III, II).

Les hybrides de la série **B** se caractérisent par la présence au sein de l'enchaînement  $\alpha$ -acylaminocarboxamide, d'une sous-structure glycine substituée. En conséquence, les nouveaux adduits de la série **B** contiennent soit un motif tacrine ou 7-MEOTA et un groupement féruloyle, tous deux liés au fragment glycine. Le groupement carbonyle de la partie glycine a été fonctionnalisée en amide par des groupements benzylamine, 2'-chloro-6'-méthylaniline ou 2'-naphtylamine dans le but d'étudier l'impact de l'introduction de nouveaux fragments sur l'activité anticholinestérasique et la capacité antioxydante.

De plus, nous avons émis l'hypothèse que la sous-structure glycine pourrait fournir d'autres groupements aromatiques capables de se fixer au PAS de l'AChe et potentiellement avoir des effets sur l'agrégation du peptide A $\beta$  (Schéma III.12).



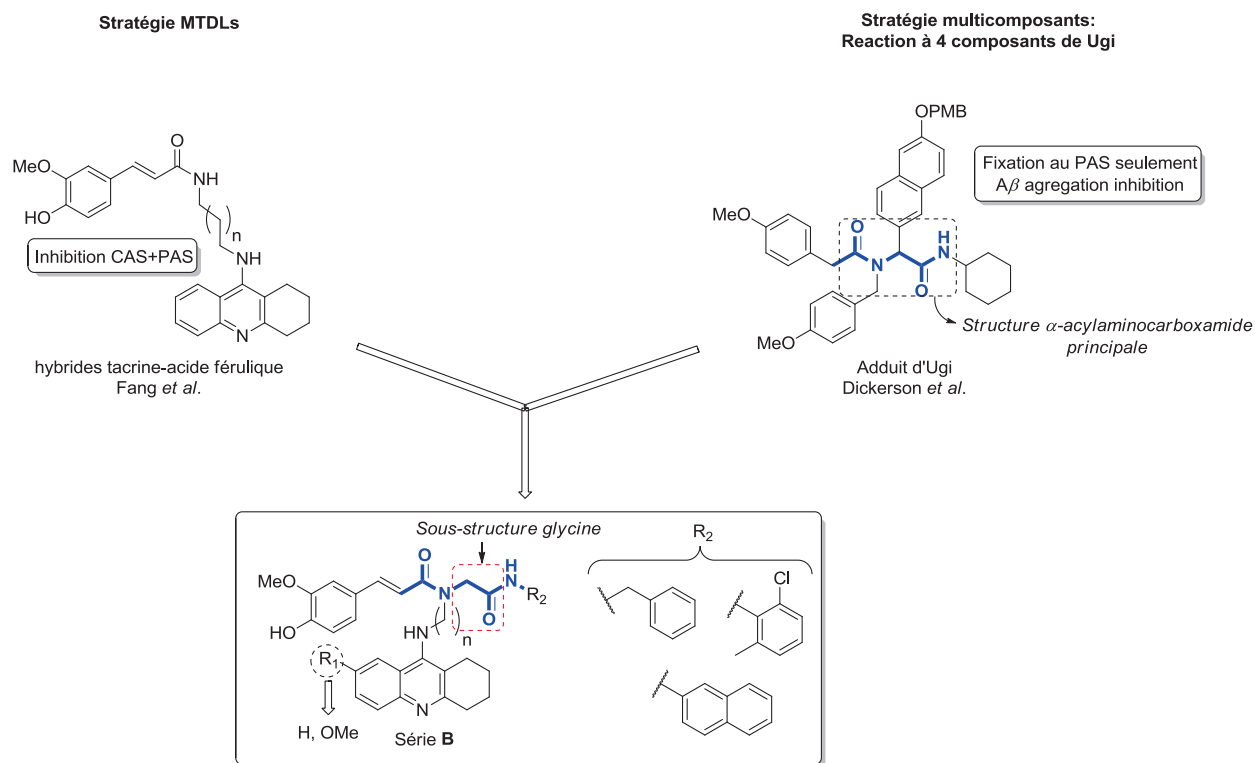


Schéma III.12. Combinaison des stratégies MTDLs et multicomposants conduisant aux nouveaux hybrides tacrine-acide férulique (série B).

### III.2.2 Synthèse de la série B

Contrairement à la série A où nous avons utilisé uniquement le méthanol, ici pour la synthèse de la série B, nous avons utilisé un mélange méthanol/dichlorométhane (3:1, v/v) en nous basant sur le protocole décrit par Pérez-Labrada *et al.* pour la synthèse de céramides et de néoglycolipides *via* la réaction de Ugi.<sup>317</sup> Cette méthode a été retenue car nous obtenons une meilleure solubilisation des substrats de départ qu'avec le méthanol seul.

Ainsi, la réaction à température ambiante de l'acide férulique, du paraformaldéhyde, de différents linkers tacrine **3a-e** et **3h** et de différents isocyanures (isocyanure de benzyle, 1-chloro-2-isocyno-3-méthylbenzène ou 2-isocyanonaphtalène) dans un mélange méthanol/dichlorométhane 3:1 (v/v) et pendant 24h, fournit les hybrides **B1-B14** avec des rendements variant de 16% à 48% (Schéma III.13 et Tableau III.4). Ces rendements moyens sont dus à des purifications successives.

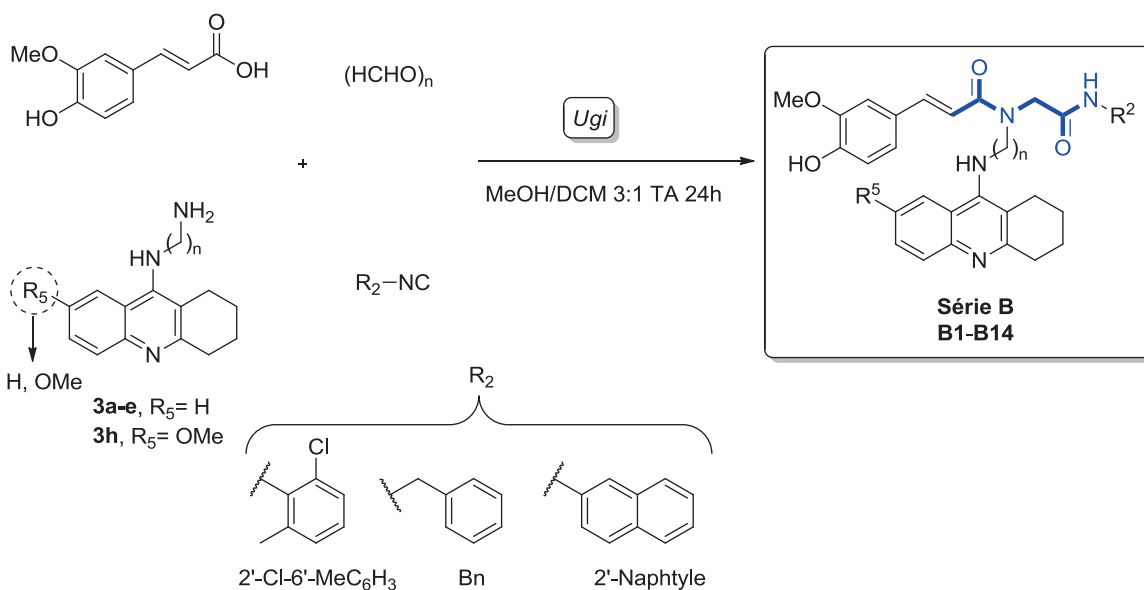

Schéma III.13. Synthèse des hybrides tacrine-acide férulique (série **B**) par la réaction de Ugi.

Tableau III.4. Répertoire des rendements de la série **B**.

Hybride	n	R <sub>2</sub>	R <sub>5</sub>	Rendement
<b>B1</b>	5	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	19%
<b>B2</b>	6	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	27%
<b>B3</b>	7	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	42%
<b>B4</b>	8	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	27%
<b>B5</b>	9	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	19%
<b>B6</b>	6	Bn	H	33%
<b>B7</b>	7	Bn	H	48%
<b>B8</b>	8	Bn	H	27%
<b>B9</b>	6	2'-Naphtyle	H	32%
<b>B10</b>	7	2'-Naphtyle	H	30%
<b>B11</b>	8	2'-Naphtyle	H	18%
<b>B12</b>	8	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	OMe	16%
<b>B13</b>	8	Bn	OMe	25%
<b>B14</b>	8	2'-Naphtyle	OMe	18%

Ces composés ont été caractérisés par FT-IR, RMN 1D/2D <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C et HRMS. Une caractéristique remarquable de ces nouveaux hybrides est la présence en solution de conformères. L'hypothèse que nous avons émise est que ces conformères résultent de la

présence des fonctions amide secondaire et tertiaire. Une étude approfondie en RMN sur certains composés de la série **B** a alors été menée sur ces différents isomères.

### III.2.3 Analyse RMN des composés **B4**, **B7** et **B13**

La liaison amide se retrouve partout dans les protéines et certaines molécules bioactives.<sup>318</sup> A cause de la délocalisation électronique du doublet libre de l'atome d'azote dans le système  $\pi$  du groupement carbonyle, le groupement fonctionnel amide est plan. L'atome d'azote est alors hybridé  $sp^2$ .

Cette délocalisation électronique rencontrée dans les amides donne un caractère de liaison double à la liaison (O)C-N. En conséquence, l'énergie nécessaire pour pivoter autour de la liaison double partielle C-N est beaucoup plus grande ( $\approx 15-20 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) que celle requise pour la rotation autour d'une liaison simple C-N ( $\approx 1.9 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ).<sup>319,320</sup> Cette énergie est appelée « barrière de rotation » (Schéma III.14).

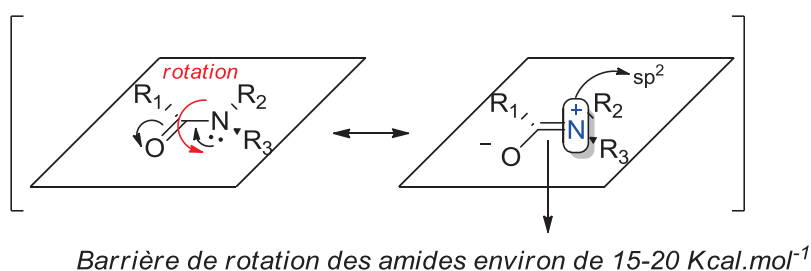


Schéma III.14. Formes mésomères d'un amide.

Ainsi, à cause d'une barrière de rotation relativement élevée, les fonctions amides secondaire et tertiaire peuvent se présenter sous la forme de deux isomères géométriques appelés conformères (ou rotamères) : un conformère **Z** (*cis*) et un conformère **E** (*trans*) (Schéma III.15).

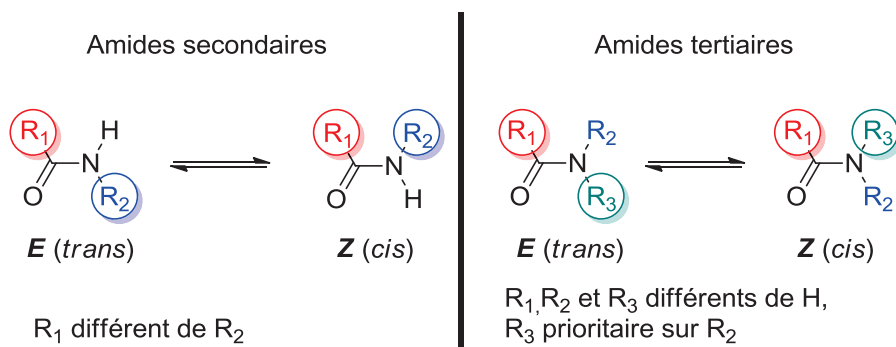


Schéma III.15. Isomérisation des amides.

Il n'est pas rare d'identifier par spectrométrie RMN, deux isomères géométriques appelés conformères ou rotamères pour les amides secondaires et tertiaires : un conformère **Z** (*cis*) et un conformère **E** (*trans*). Cependant, leur présence dépend fortement de la température à laquelle l'échantillon est analysé et des différents substituants  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$ . Il est intéressant aussi de noter que les temps de demi-vie sont plus élevés dans le cas de conformères d'amides tertiaires car l'interconversion devient plus difficile.

Une analyse RMN approfondi ( $^1\text{H}$  température variable,  $^{13}\text{C}$ , gCOSY, TOCSY, gHSQC, gHMBC, NOESY (EXSY), ROESY) de certains composés de la série **B** a ainsi été réalisée pour lever le voile sur ces conformères présents en solution. Un spectromètre RMN Varian, opérant à 500 MHz pour le  $^1\text{H}$  et 125 MHz pour le  $^{13}\text{C}$ , a été utilisé. Comme exemples représentatifs de la série **B**, nous avons choisi d'étudier les composés **B4**, **B7** et **B13**. Ces adduits présentant à la fois un amide secondaire et tertiaire, il a été nécessaire de considérer un modèle dynamique complexe où quatre conformères existent en même temps. En effet, les différents spectres RMN 1D/2D indiquent la présence d'un mélange de rotamères non séparables qui montrent deux groupements de signaux différents en  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Schéma III.16)

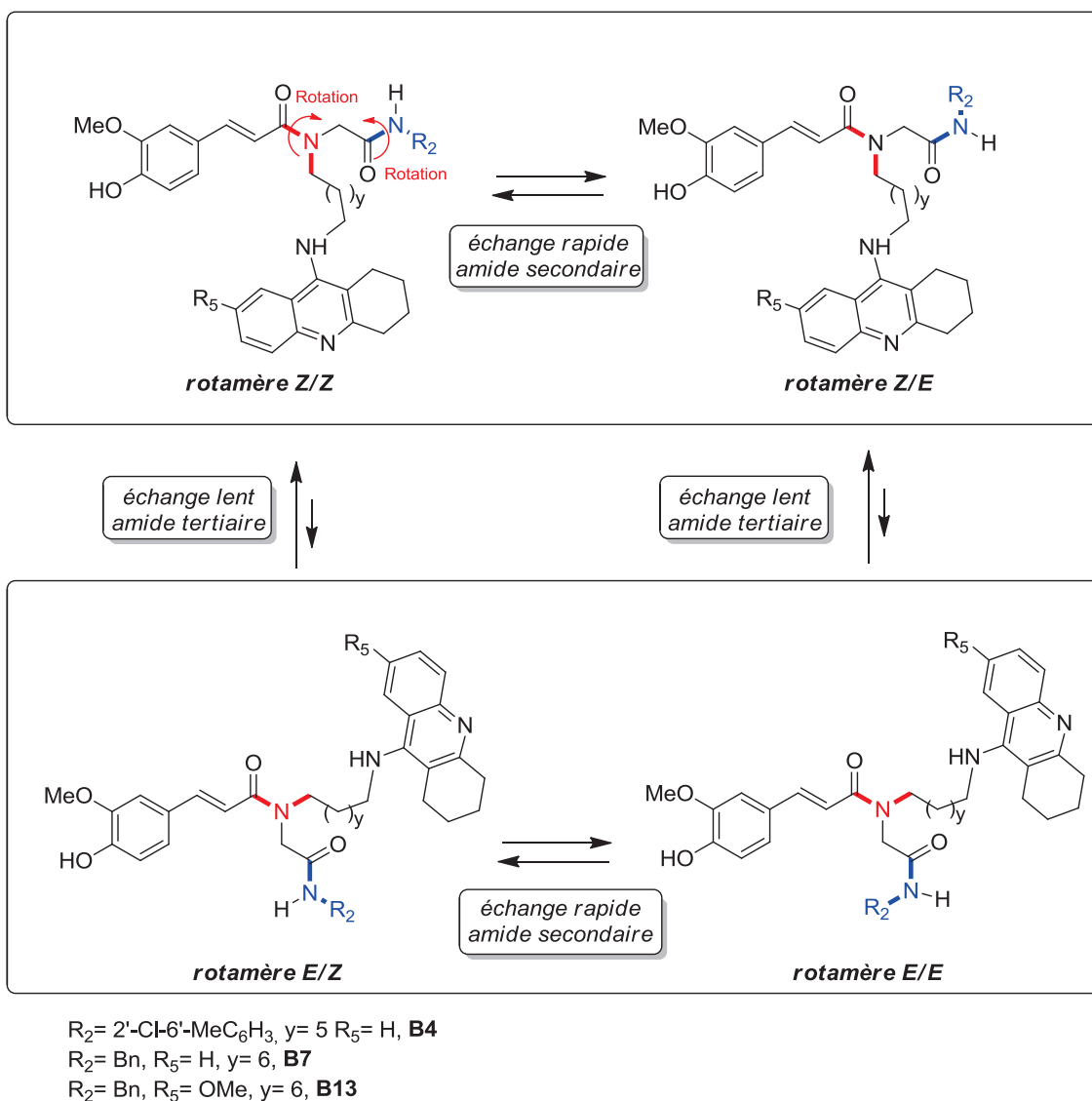


Schéma III.16. Équilibre conformationnel pour les hybrides **B4**, **B7** et **B13** (T= 298 K).

Les spectres  $^1\text{H}$  des composés **B4**, **B7** et **B13**, acquis à 298 K dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ , a montré deux jeux de signaux, en particulier pour les protons proches des amides tertiaire et secondaire (protons H-2, H-3, H-10, H-12 et H-1'). Le schéma montre les principales corrélations longues distances  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  gHMBC obtenus pour les composés **B4**, **B7** et **B13** (Schéma III.17).

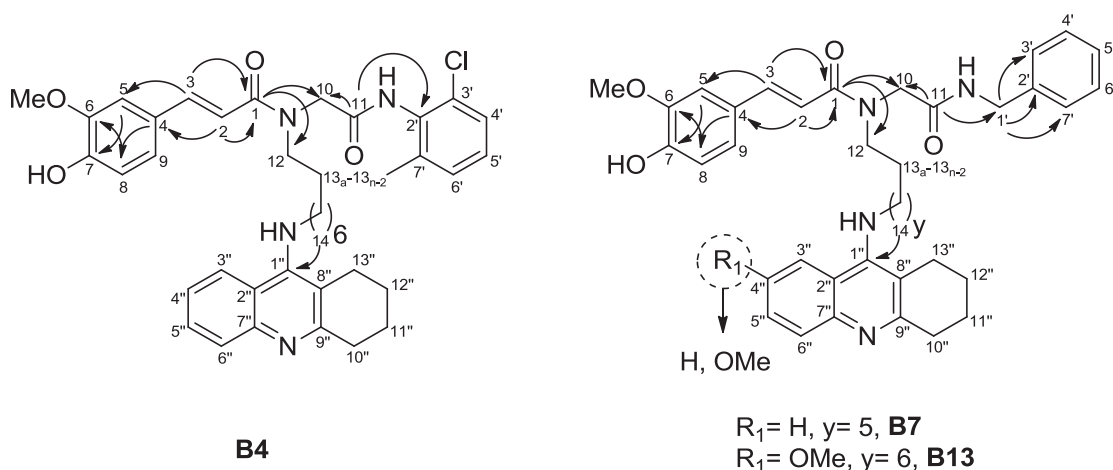


Schéma III.17. Corrélations principales gHMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, T= 298 K) pour les composés **B4**, **B7** et **B13**.

Pour aller plus loin, nous avons effectué l'analyse conformationnelle de l'hybride **B13**. Cette étude a été menée en deux étapes. La première étape a consisté en la description complète des deux sous-spectres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C coexistant en solution. La seconde étape a consisté en l'assignement des différents systèmes de spin pour chaque rotamère au moyen des expériences à deux dimensions <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY(EXSY) et ROESY.<sup>321</sup>

Pour confirmer l'existence d'un processus dynamique, des spectres RMN <sup>1</sup>H du composé **B13** à différentes températures ont été acquis (298 K, 313 K et 333 K). Comme il est montré dans la figure III.1, le spectre RMN <sup>1</sup>H à 298 K montre deux jeux de signaux peuplés de manière inégale. Par déconvolution des protons éthyléniques H-2<sub>M</sub>/H-2<sub>m</sub> et H-3<sub>M</sub>/H-2<sub>m</sub>, nous obtenons des fractions molaires de 0.63 pour le conformère majoritaire et 0.37 pour le conformère minoritaire. Nous constatons également que les signaux coalescent progressivement avec l'augmentation de la température.

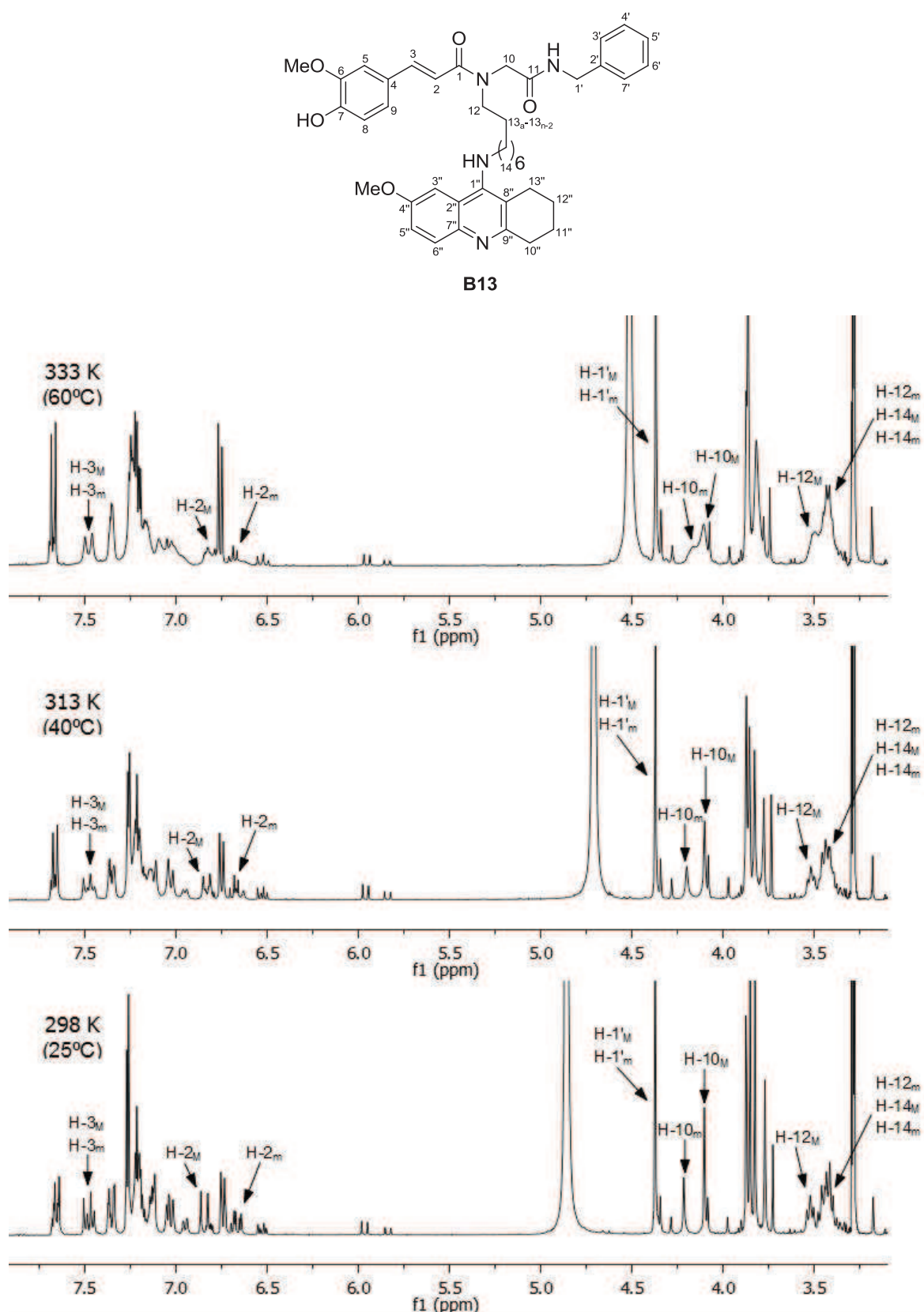
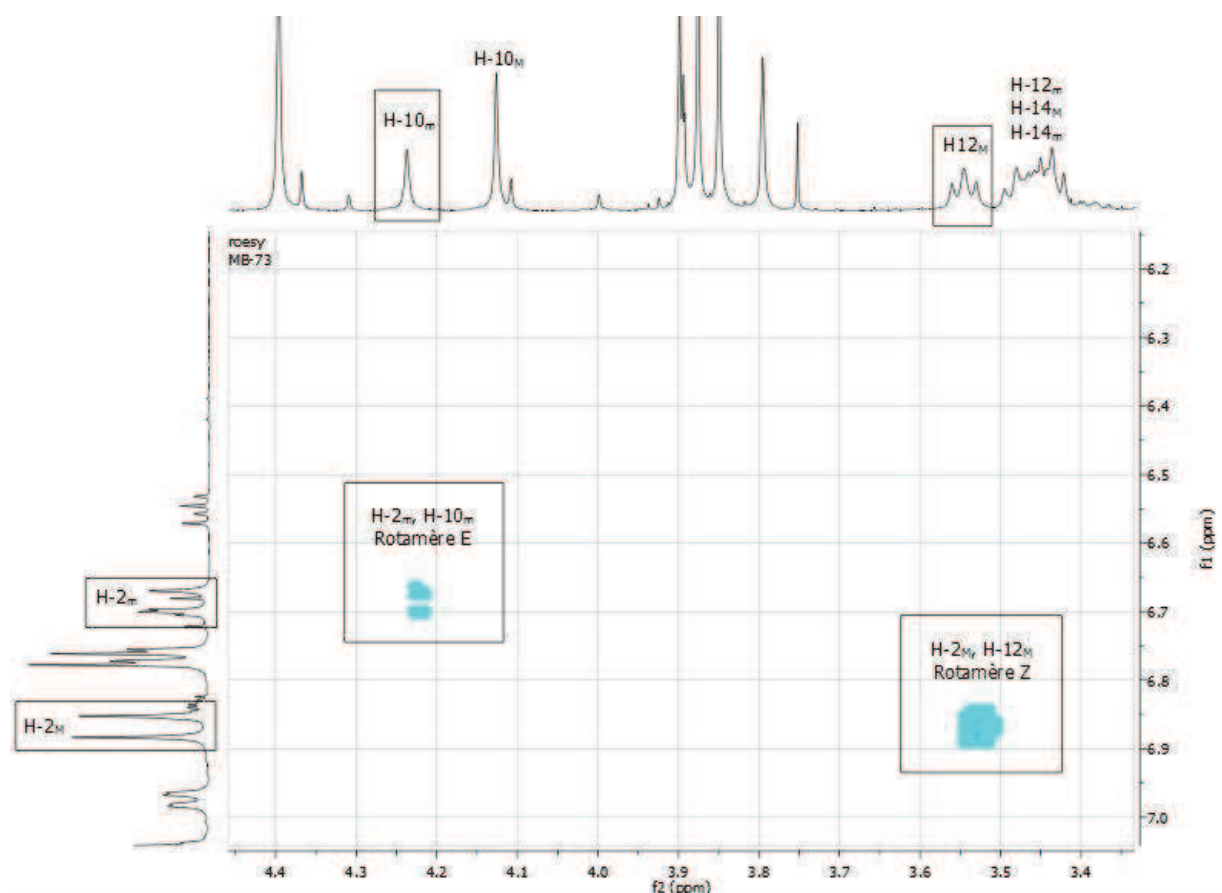


Figure III.1. Coupes de spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **B13** à différentes températures. M: conformère majoritaire, m: conformère minoritaire.

L'attribution des différents systèmes de spin pour chaque rotamère en particulier a été effectuée grâce à des expériences NOESY(EXSY) et ROESY à 298 K. Ces expériences RMN à deux dimensions permet de mettre en valeur deux noyaux proches dans l'espace. Ainsi, les tâches de corrélations hors diagonale proviennent de l'effet Overhauser (NOE : *Nuclear Overhauser Effect*) entre deux protons non liés entre eux de manière covalente et proches dans l'espace.

Ainsi sur le spectre ROESY, pour l'ensemble de signaux majoritaires, la tâche de corrélation entre les protons H-2<sub>M</sub> et H-12<sub>M</sub> démontre la présence du rotamère Z au niveau de l'amide tertiaire. Pour l'ensemble de signaux minoritaires, la tâche de corrélation existante entre les protons H-2<sub>m</sub> et H-10<sub>m</sub> prouve la présence du rotamère E au niveau de l'amide tertiaire. De plus, deux tâches de corrélation entre les protons H-1' et H-10 ont été observées pour les deux ensembles de signaux minoritaires et majoritaires. Ceux-ci correspondent à l'échange conformationnel au niveau de l'amide secondaire (Figure III.2).





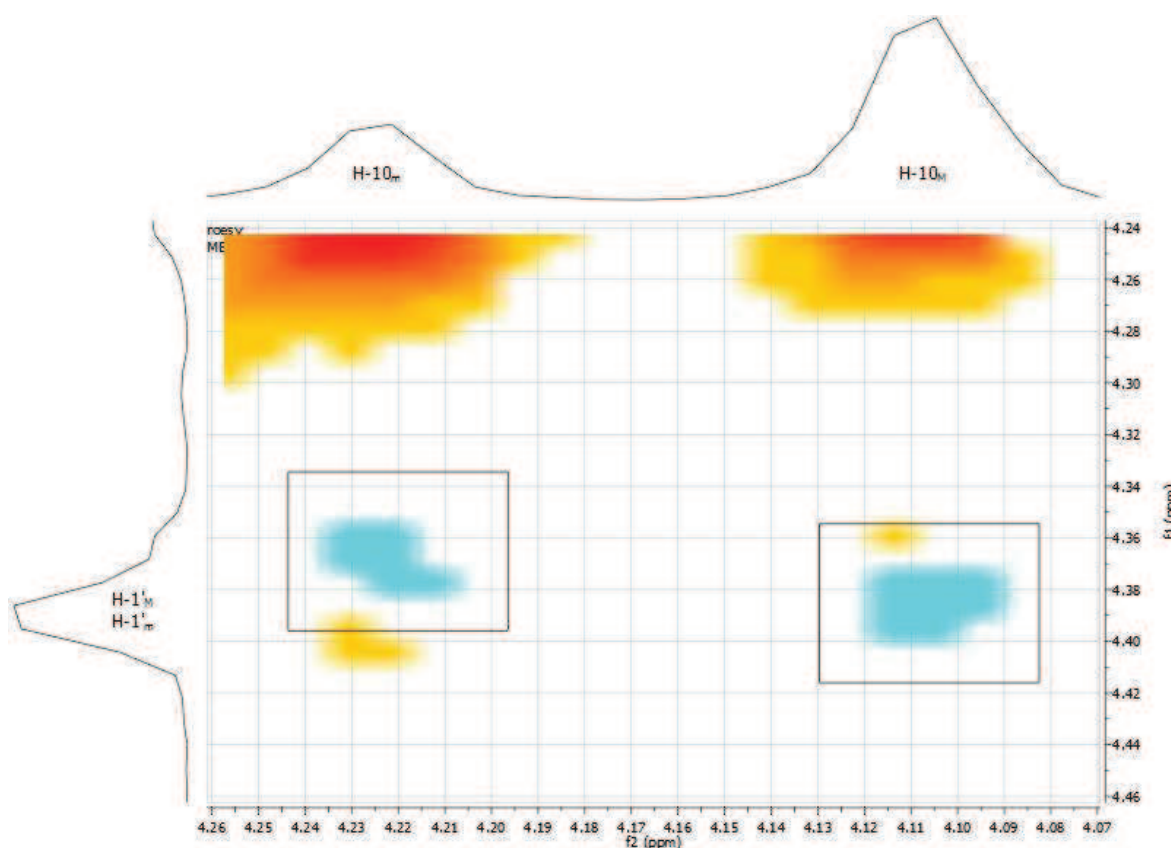


Figure III.2. Agrandissements du spectre ROESY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, T= 298 K) du composé **B13** montrant les corrélations d'intérêt. M: conformère majoritaire, m: conformère minoritaire.

Enfin, nous avons effectué une expérience RMN <sup>1</sup>H dynamique (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) dans la gamme de température 296.3-333 K pour étudier le processus cinétique associé à la rotation autour de la liaison (O)C-N de l'amide tertiaire du composé **B13**. Pour cela, nous avons utilisé l'équation d'Eyring :

$$R \ln \frac{hk_r}{\kappa k_b T} = - \frac{\Delta H^*}{T} + \Delta S^*$$

Equation III.1. Equation d'Eyring.

Où  $k_r$  représente la constante de vitesse réactionnelle déterminé à partir d'une simulation *in silico* d'échange chimique (en s<sup>-1</sup>), R la constante universelle des gaz parfaits (1.987 cal.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>), h la constante de Planck (6.626×10<sup>-34</sup> m<sup>2</sup>.kg.s<sup>-1</sup>),  $\kappa$  le coefficient de transmission (coefficient correctif, par défaut= 1, sans unité),  $k_b$  la constante de Boltzmann (1.380×10<sup>-23</sup> m<sup>2</sup>.kg.s<sup>-2</sup>.K<sup>-1</sup>) et T la température absolue (en Kelvin).  $\Delta H^*$  (en cal.mol<sup>-1</sup>) et  $\Delta S^*$  (en cal.mol<sup>-1</sup>

$^1\text{K}^{-1}$ ) représente respectivement, l'enthalpie et l'entropie d'activation de l'échange conformationnel. Pour chaque température, une vitesse d'interconversion est associée. Ainsi, les constantes de vitesse  $k_r$  ont été extrapolées pour chaque température à partir de corrélations entre les spectres  $^1\text{H}$  expérimentales et ceux simulés avec le logiciel gNMR.<sup>322</sup> A titre d'illustration, trois spectres  $^1\text{H}$  effectués à 298 K, 313 K et 333 K sont montrés dans la figure III.3.

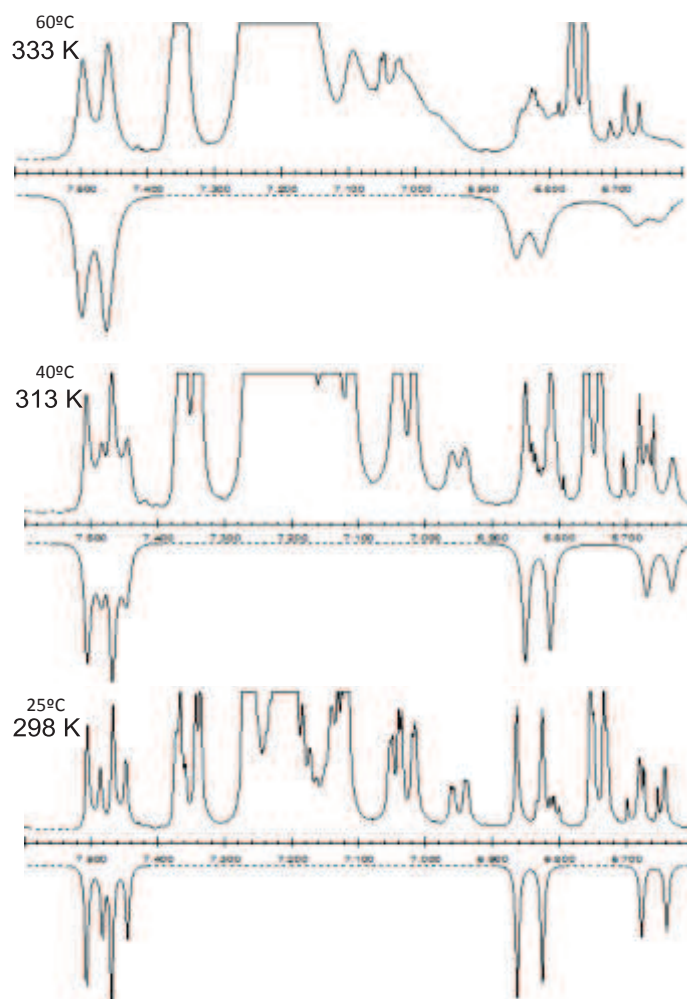


Figure III.3. Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) expérimental (haut) et simulé par gNMR (bas) pour le composé **B13** à différentes températures.

Une fois les valeurs de  $k_r$  obtenues à différentes températures, nous avons déterminé graphiquement l'enthalpie  $\Delta H^*$  et l'entropie  $\Delta S^*$  d'activation, associées à l'interconversion au niveau de l'amide tertiaire, en nous basant sur les données comprises dans le tableau III.5:

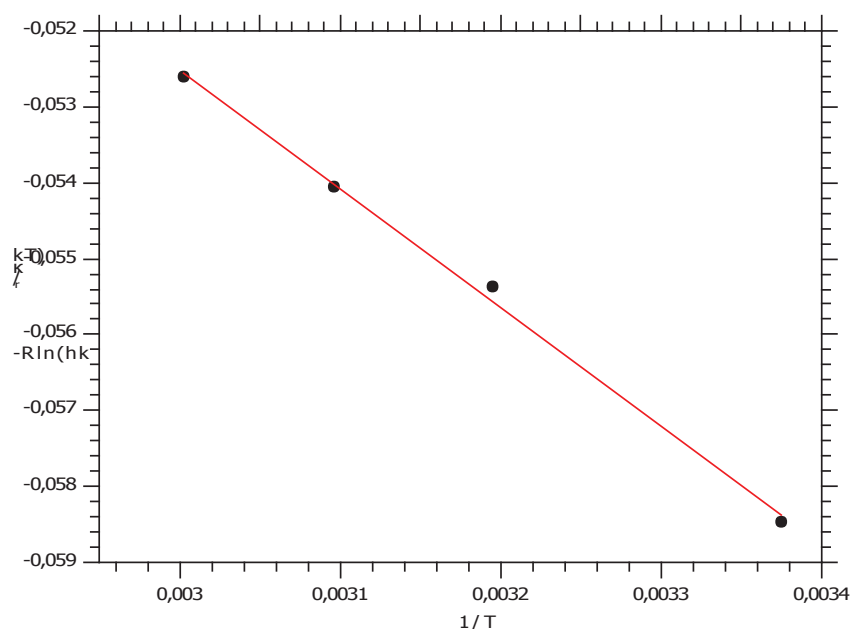
Tableau III.5. Données requises pour la construction de la droite d'Eyring.

T(K)	T (°C)	1/T	k <sub>r</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>r</sub> /T	ln(k <sub>r</sub> /T)	-Rln(hk <sub>r</sub> /k <sub>B</sub> T)
296,3	23,3	0.00337496	1	0.00337496	-5.69137	-0.058461
313	40	0.00319489	5	0.0159744	-4.13677	-0.0553751
323	50	0.00309598	10	0.0309598	-3.47507	-0.0540616
333	60	0.003003	21,6	0.0648649	-2.73545	-0.0525935

La droite d'Eyring nous a permis de déduire les valeurs suivantes (Graphique III.1.):

- la pente,  $\Delta H^* = + 15.7 \times 10^3 \text{ cal.mol}^{-1}$
- l'ordonnée à l'origine,  $\Delta S^* = - 5.5 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$

Ces valeurs sont dans la même gamme que ceux trouvées pour d'autres amides.

Graphique III.1. Droite d'Eyring pour le composé **B13**,  $r^2 = 0.998$ .

En conclusion, ces résultats suggèrent l'existence de deux ensembles de conformères **B13-Z** et **B13-E**, dû à l'interconversion lente au niveau de l'amide tertiaire. Ces ensembles sont eux-mêmes composés de deux sous-ensembles résultant d'un échange rapide au niveau de l'amide secondaire. Nous obtenons d'une part, les conformères **B13-Z/Z** et **B13-Z/E** majoritaires, et d'autre part, **B13-E/Z** et **B13-E/E** minoritaires (Schéma III.18).

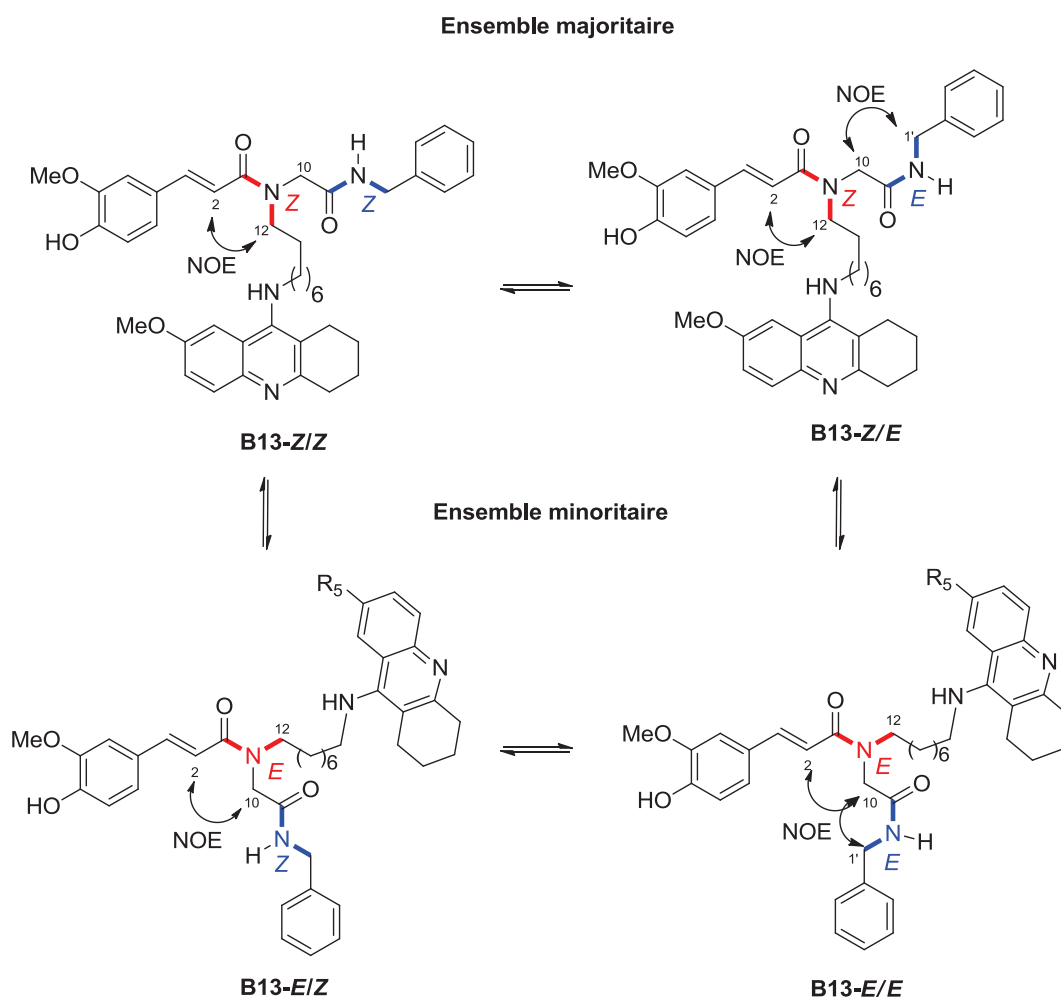


Schéma III.18. Les différents rotamères de **B13** présents en solution dans CD<sub>3</sub>OD à 298 K.

## III.2.4 Evaluation de l'hépatotoxicité

### III.2.4.1 Introduction

La tacrine étant connu pour être hépatotoxique (toxique pour le foie),<sup>323</sup> nous avons évalué en premier lieu la toxicité potentielle des composés de la série **B** sur la lignée cellulaire d'hépatoblastomes humain HepG2. Les cellules HepG2 représentent un modèle fiable pour l'étude *in vitro* du métabolisme des xénobiotiques et de l'hépatotoxicité. Elles sont ainsi largement utilisées dans l'étude des mécanismes d'action de principes actifs.<sup>324</sup>

### III.2.4.2 Le test MTT

La toxicité potentielle de notre série **B** sur les cellules HepG2 a été déterminée grâce au test MTT.<sup>325</sup> Le principe de ce test colorimétrique repose sur la capacité de l'enzyme succinate déhydrogénase (famille des oxydoréductases), présente dans la mitochondrie, à réduire le noyau tétrazole du réactif de couleur jaune MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), en cristaux de formazan violets dans les cellules métaboliquement viables (Schéma III.19).

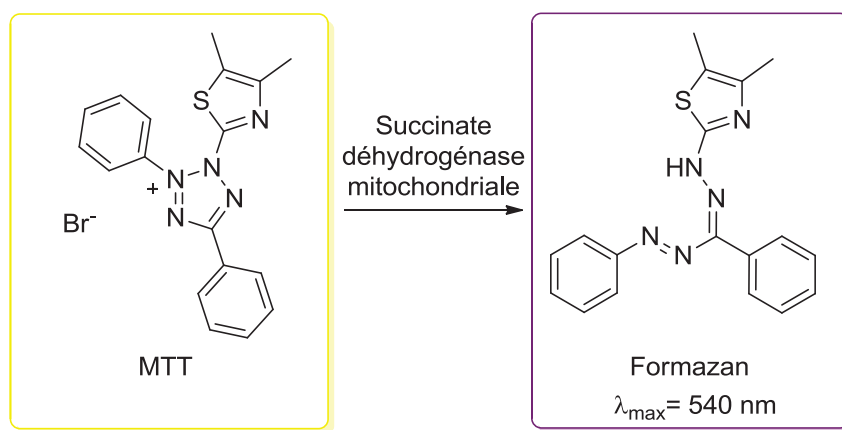


Schéma III.19. Le test MTT.

Après incubation à 37°C, avec différentes concentrations de composé testé, les cellules viables contenant le formazan sont récoltées et resolubilisées dans le DMSO. Par la suite, un dosage de l'absorbance par spectrophotométrie UV à 540 nm permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes par rapport à un groupe contrôle. Ainsi, plus la couleur mauve est prononcée, meilleure est la viabilité cellulaire.

### III.2.4.3 Viabilité des hépatocytes HepG2

Le tableau III.6 regroupe les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus pour des concentrations en composé comprises entre 1 µM et 1000 µM. La tacrine a montré, comme attendu, une toxicité croissante sur la gamme de concentration choisie (de 93.4% à 1 µM jusqu'à 34.4% à 1000 µM), avec un point d'inflexion se situant à 100 µM.

Globalement, l'effet hépatotoxique de la série **B**, après 24h d'incubation, est moindre que celui exercé par la tacrine. Si l'on se penche les relations structure-activité (SAR), plusieurs tendances apparaissent se basant sur les valeurs recueillies à 1000  $\mu\text{M}$  (la plus haute concentration étudiée). Sans surprise, et en accord avec la logique de leur conception, les hybrides portant un fragment 7-MEOTA (**B12-B14**) sont moins toxiques que les autres hybrides portant une tacrine « nue ». Les hybrides les moins toxiques sont **B13** ( $n=8$ ,  $R_2=2'$ -naphtyle, 59.2% à 1000  $\mu\text{M}$ ) et **B14** ( $n=8$ ,  $R_2=\text{benzyle}$ , 59.4%), étant 1.7 fois moins toxique que la tacrine. L'hybride **B9** ( $n=6$ ,  $R_2=2'$ -chloro-6'-méthylphényle,  $R_1=H$ ) s'est révélé être le plus toxique de la série **B** (36.3% à 1000  $\mu\text{M}$ ).

Parmi les hybrides **B1-B5** portant un motif 2'-chloro-6'-méthylphényle, le composé **B1** ( $n=5$ ) est le moins toxique (50.9 %, 1.5 fois moins toxique que la tacrine à 1000  $\mu\text{M}$ ). Cependant la toxicité augmente chez les hybrides **B2**, **B3**, **B4** et se stabilise pour l'adduit **B5** (47.2% à 1000  $\mu\text{M}$ ) possédant un linker nonaméthylène.

En considérant les hybrides **B6-B8** avec un fragment benzyle, nous notons une légère augmentation de la toxicité du composé **B6** (48.9% à 1000  $\mu\text{M}$ ) au composé **B7** (46.3% à 1000  $\mu\text{M}$ ). Le composé **B8** (56.3% à 1000  $\mu\text{M}$ ) est quant à lui, 1.6 fois moins toxique que la tacrine. Pour les hybrides **B9-B11** avec  $R_2=2'$ -naphtyle, la toxicité diminue avec l'augmentation de la taille du linker (toujours à 1000  $\mu\text{M}$ ).

De manière générale, le type de substituant sur le fragment glycine semble influencer la toxicité sur les cellules HepG2. En effet, en comparant la toxicité des hybrides ayant la même longueur de linker et différents groupements  $R_2$ , les hybrides avec  $R_2=\text{benzyle}$  (**B6** ( $n=6$ ), **B7** ( $n=7$ ) et **B8** ( $n=8$ )) sont toujours moins toxiques que leurs analogues avec  $R_2=2'$ -naphtyle et 2'-chloro-6'-méthylphényle.

Tableau III.6. Viabilité *in vitro* des cellules HepG2 en présence des composés de la série **B** et de la tacrine.<sup>a</sup>

Hybride	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	300 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
<b>B1</b>	99.3 $\pm$ 1.7 <sup>ns</sup>	98.9 $\pm$ 1.7 <sup>ns</sup>	96.4 $\pm$ 1.3 <sup>ns</sup>	66.1 $\pm$ 1.1***	62.9 $\pm$ 1.3***	57.9 $\pm$ 2.5***	50.9 $\pm$ 4.1***
<b>B2</b>	99.5 $\pm$ 1.3 <sup>ns</sup>	87.4 $\pm$ 1.2**	85.9 $\pm$ 1.6***	71.4 $\pm$ 1.1***	48.7 $\pm$ 2.0***	47.5 $\pm$ 2.0***	43.2 $\pm$ 1.1***
<b>B3</b>	96.1 $\pm$ 1.1 <sup>ns</sup>	88.8 $\pm$ 1.3 <sup>ns</sup>	85.4 $\pm$ 1.8*	82.4 $\pm$ 1.5**	50.5 $\pm$ 2.6***	46.8 $\pm$ 4.1***	43.5 $\pm$ 3.1***
<b>B4</b>	98.4 $\pm$ 0.7 <sup>ns</sup>	96.3 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>	88.7 $\pm$ 1.1*	83.8 $\pm$ 1.4***	50.2 $\pm$ 2.6***	50.6 $\pm$ 2.2***	43.3 $\pm$ 1.9***
<b>B5</b>	100.0 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>	97.6 $\pm$ 1.6 <sup>ns</sup>	95.6 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	71.8 $\pm$ 1.7***	54.2 $\pm$ 1.1***	53.5 $\pm$ 0.7***	47.2 $\pm$ 2.9***
<b>B6</b>	97.0 $\pm$ 1.9 <sup>ns</sup>	92.3 $\pm$ 2.1 <sup>ns</sup>	91.8 $\pm$ 1.9 <sup>ns</sup>	92.7 $\pm$ 1.9 <sup>ns</sup>	63.3 $\pm$ 3.7***	50.5 $\pm$ 3.8***	48.9 $\pm$ 4.4***
<b>B7</b>	85.3 $\pm$ 2.4 <sup>ns</sup>	79.0 $\pm$ 3.8*	76.0 $\pm$ 1.3**	73.1 $\pm$ 3.9**	47.2 $\pm$ 3.1***	47.0 $\pm$ 3.4***	46.3 $\pm$ 2.1***
<b>B8</b>	95.2 $\pm$ 1.5 <sup>ns</sup>	95.2 $\pm$ 1.7 <sup>ns</sup>	94.4 $\pm$ 1.7 <sup>ns</sup>	81.2 $\pm$ 1.0***	61.8 $\pm$ 0.2***	60.1 $\pm$ 1.0***	56.3 $\pm$ 2.0***
<b>B9</b>	97.1 $\pm$ 2.6 <sup>ns</sup>	96.0 $\pm$ 0.4 <sup>ns</sup>	94.8 $\pm$ 1.6 <sup>ns</sup>	89.7 $\pm$ 1.9 <sup>ns</sup>	48.0 $\pm$ 2.8***	40.7 $\pm$ 2.3***	36.3 $\pm$ 1.9***
<b>B10</b>	99.2 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>	95.0 $\pm$ 0.8 <sup>ns</sup>	94.5 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	92.8 $\pm$ 1.2 <sup>ns</sup>	63.2 $\pm$ 2.9***	44.2 $\pm$ 1.3***	39.3 $\pm$ 2.0***
<b>B11</b>	97.5 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	96.1 $\pm$ 0.6 <sup>ns</sup>	95.9 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>	91.8 $\pm$ 0.9 <sup>ns</sup>	74.6 $\pm$ 2.8***	46.8 $\pm$ 1.4***	46.1 $\pm$ 2.3***
<b>B12</b>	93.5 $\pm$ 2.4 <sup>ns</sup>	94.5 $\pm$ 1.5 <sup>ns</sup>	88.8 $\pm$ 1.6***	56.6 $\pm$ 0.9***	51.4 $\pm$ 1.7***	52.4 $\pm$ 1.4***	50.8 $\pm$ 1.0***
<b>B13</b>	100.3 $\pm$ 1.1 <sup>ns</sup>	98.9 $\pm$ 1.8 <sup>ns</sup>	97.9 $\pm$ 2.8 <sup>ns</sup>	98.1 $\pm$ 0.9 <sup>ns</sup>	97.0 $\pm$ 2.7 <sup>ns</sup>	60.3 $\pm$ 2.9***	59.2 $\pm$ 1.6***
<b>B14</b>	98.8 $\pm$ 2.4 <sup>ns</sup>	97.0 $\pm$ 1.8 <sup>ns</sup>	92.0 $\pm$ 3.0 <sup>ns</sup>	94.0 $\pm$ 3.8 <sup>ns</sup>	83.2 $\pm$ 2.5*	74.0 $\pm$ 1.4***	59.4 $\pm$ 4.7***
<b>Tacrine</b>	93.4 $\pm$ 4.7 <sup>ns</sup>	90 $\pm$ 3.0 <sup>ns</sup>	88.7 $\pm$ 3.4 <sup>ns</sup>	81.6 $\pm$ 4.9*	64.3 $\pm$ 4.5***	40 $\pm$ 2.2***	34.4 $\pm$ 2.7***

<sup>a</sup>Tous les hybrides ont été incubés pendant 24h. La viabilité cellulaire est normalisée en % par rapport au groupe contrôle. Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins trois différentes cultures. Tous les composés ont été testés en concentrations croissante (1-1000  $\mu$ M). \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$  et ns: non significative, en comparaison avec le groupe contrôle. La comparaison entre les hybrides testés et le groupe contrôle a été réalisée grâce au test statistique one-way ANOVA suivie du test de Newman-Keuls.

### III.2.5 Evaluation de l'inhibition des cholinestérases

Après avoir testé nos composés de la série **B** sur la viabilité des cellules hépatiques HepG2, nous avons évalué la capacité de cette même série à inhiber des cholinestérases de différentes origines taxonomiques. Dans un premier temps, nous avons testé nos composés sur l'EeAChE et la eqBuChE pour avoir un profil global d'inhibition puis dans un second temps, nous avons affiné nos résultats en utilisant les cholinestérases humaine (hAChE et hBuChE) qui représentent un modèle plus concret d'étude. Nous avons utilisé le protocole d'Ellman (cf. Chap. III, II.2.1) pour la détermination du pouvoir anticholinestérasique<sup>311</sup> et pris la tacrine, la 7-MEOTA et l'acide férulique comme références.

*III.2.5.1 Cholinestérases de source animale*

Le tableau III.7 rassemble les résultats d'inhibition sur *EeAChE* et *eqBuChE*. En premier lieu, nous remarquons que les hybrides les moins hépatotoxiques **B12-B14** portant un motif 7-MEOTA sont les moins actifs en comparaison avec les autres hybrides de la série. L' $IC_{50}$  du composé **B14** n'a pas pu être déterminée à cause d'un problème de solubilité dans le milieu utilisé lors du test d'Ellman (PBS, pH= 8.0). A l'inverse, les hybrides **B1-B11** se sont révélés être de bons inhibiteurs de la *eqBuChE* avec des  $IC_{50}$  de l'ordre du nanomolaire et des sélectivités allant de 1.6 (**B2**) à 115.5 (**B1**). L'hybride **B1** est l'inhibiteur le plus actif de la *eqBuChE* ( $IC_{50}$ =  $1.0 \pm 0.2$  nM, 5 fois plus puissant que la tacrine) alors que le meilleur pouvoir anticholinestérasique sur l'*EeAChE* est obtenu pour le composé **B3** ( $IC_{50}$ =  $6.2 \pm 0.7$  nM, 7 fois plus puissant que la tacrine).

En se basant sur le substituant  $R_2$  porté par le fragment glycine, les hybrides **B1-B5** avec un motif 2'-chloro-6'-methylphenyle sont de meilleurs inhibiteurs de la *eqBuChE* que les hybrides portant des fragments benzyle (**B6-B8**) ou 2'-naphtyle (**B9-B11**). Si l'on regarde maintenant l'influence de la longueur de la chaîne diaminoalkyle sur l'activité inhibitrice des hybrides **B1-B5**, nous remarquons que la meilleure inhibition de la *eqBuChE* est obtenue avec un linker pentaméthylène. Cette activité diminue ainsi légèrement de  $n=6$  à  $n=9$  tout en restant aux alentours de 3 nM. Cependant, pour les composés **B6-B8**, l'activité augmente de  $n=6$  à  $n=8$ . Dans la série **B9-B11**, l'inhibition de la *EeAChE* augmente avec la taille du linker, de 48.4 nM (**B9**,  $n=6$ ) à 14.9 nM (**B11**,  $n=8$ ).

En considérant que les inhibitions de la *EeAChE* et de la *eqBuChE*, nous pouvons affirmer que les hybrides **B3** et **B4** présentent un profil anticholinestérasique acceptable avec des  $IC_{50}$  autour de 6.3 nM pour *EeAChE* et 2.5 nM pour la *eqBuChE*. Cependant, en tenant compte des résultats recueillis précédemment sur la viabilité des cellules HepG2, nous trouvons que les hybrides les plus intéressants sont les composés **B8**, **B1** et **B5**, dans cet ordre, en étant 1.5, 1.45 et 1.34 fois moins toxiques sur les cellules HepG2 que la tacrine à 300  $\mu$ M. De plus, ces hybrides présentent tout de même une excellente activité sur les cholinestérases et plus particulièrement, sur la *eqBuChE*.



Tableau III.7. Inhibitions ( $IC_{50}$ , nM) de l'*EeAChE* et la *eqBuChE* par la série **B** et la tacrine.

Hybride	n	R <sub>2</sub>	R <sub>5</sub>	<i>EeAChE</i> <sup>a</sup>	<i>eqBuChE</i> <sup>a</sup>	Sélectivité <sup>b</sup>
<b>B1</b>	5	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	115.5±6.5	1.0±0.2	115.5
<b>B2</b>	6	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	5.4±0.6	3.3±0.3	1.6
<b>B3</b>	7	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	6.2±0.7	2.6±0.3	2.4
<b>B4</b>	8	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	6.5±0.1	2.4±0.1	2.7
<b>B5</b>	9	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	26.8±1.9	3.0±0.3	9.0
<b>B6</b>	6	Bn	H	14.6±2.1	6.0±1.9	2.4
<b>B7</b>	7	Bn	H	14.1±0.9	2.8±0.1	5.0
<b>B8</b>	8	Bn	H	7.6±0.4	2.8±0.1	2.7
<b>B9</b>	6	2'-Naphthyle	H	48.4±0.4	9.1±1.3	5.3
<b>B10</b>	7	2'-Naphthyle	H	25.3±4.8	11.7±2.2	2.2
<b>B11</b>	8	2'-Naphthyle	H	14.9±1	5.9±0.3	2.6
<b>B12</b>	8	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	OMe	134.3±8.1	88.9±5.7	1.5
<b>B13</b>	8	Bn	OMe	110.0±8.4	48.8±2.3	2.3
<b>B14</b>	8	2'-Naphthyle	OMe	51.9±3.5 <sup>c</sup>	70.5±1.8 <sup>c</sup>	-
<b>Tacrine</b>	-	-	-	44.3±1.5	5.1±0.2	8.7

<sup>a</sup>Les courbes d'inhibitions ont été obtenues par régression non linéaire. Chaque  $IC_{50}$  est la moyenne  $\pm$  SEM de quadruplicat d'au moins 3 différentes expériences. <sup>b</sup>Ratio  $IC_{50}(EeAChE)/IC_{50}(eqBuChE)$ . <sup>c</sup>Pourcentage d'inhibition à 3  $\mu$ M.

Ces premiers résultats d'inhibition sur les cholinestérases d'origine animale nous ont confortés dans le choix d'un motif tacrine greffé sur un squelette  $\alpha$ -acylaminocarboxamide et nous ont permis d'aller plus loin et d'analyser la capacité des hybrides de la série **B** à inhiber les cholinestérases humaines.

### III.2.5.2 Cholinestérases de source humaine

Les résultats d'inhibition sont présentés dans le tableau III.8. De manière similaire aux données récoltées sur l'inhibition des cholinestérases d'origine animale, les hybrides **B12-B13**, avec un motif 7-MEOTA, possèdent une faible activité anticholinestérasique sur hAChE mais restent meilleurs inhibiteurs que la 7-MEOTA. A l'instar de l'évaluation sur *EeAChE*, nous soulignons la faible activité en hAChE du composé **B14** (22.2% d'inhibition à 3  $\mu$ M) dont l' $IC_{50}$  n'a pas pu être déterminé pour la même raison citée auparavant (problème de solubilité). Le composé **B14** a néanmoins présenté une inhibition correcte de la hBuChE (68.2 nM). Les hybrides **B1-B11** ont montré de bonnes inhibitions sur l'hAChE et d'excellentes inhibitions sur la hBuChE (inférieur à 1 nM, sauf pour **B6**) avec des sélectivités s'échelonnant de 40.9 (**B8**) à 292.3 (**B11**). Les valeurs d' $IC_{50}$  pour l'inhibition de la hBuChE sont beaucoup

plus faibles pour les séries **B1-B5** (de 0.307 à 0.968 nM), **B6-B8** (de 0.98 à 2.51 nM) et **B9-B11** (0.260 à 2.48 nM) en comparaison avec les valeurs obtenues pour la eqBuChE.

Tableau III.8. Inhibitions ( $IC_{50}$ , nM) de l'hAChE et la hBuChE par la série **B** et les composés références.

Hybride	n	R <sub>2</sub>	R <sub>5</sub>	hAChE <sup>a</sup>	hBuChE <sup>a</sup>	Sélectivité <sup>b</sup>
<b>B1</b>	5	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	52.3±4.3	0.717±0.038	72.9
<b>B2</b>	6	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	102±6	0.968±0.055	105.4
<b>B3</b>	7	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	70.0±4.1	0.307±0.020	228
<b>B4</b>	8	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	42.5±2.9	0.336±0.028	126.5
<b>B5</b>	9	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	14.3±1.1	0.318 0.024	45.0
<b>B6</b>	6	Bn	H	169±10	2.51±0.17	67.3
<b>B7</b>	7	Bn	H	71.0±4.3	1.06±0.07	67.0
<b>B8</b>	8	Bn	H	40.1±2.8	0.98±0.09	40.9
<b>B9</b>	6	2'-Naphtyle	H	174±15	2.48±0.21	70.1
<b>B10</b>	7	2'-Naphtyle	H	65.0±3.3	0.737±0.071	88.2
<b>B11</b>	8	2'-Naphtyle	H	76.5±6.8	0.260±0.021	292.3
<b>B12</b>	8	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	OMe	2119±136	14.8±1.1	143.2
<b>B13</b>	8	Bn	OMe	1326±43	49.0±2.6	27.1
<b>B14</b>	8	2'-Naphtyle	OMe	22.2±1.6 <sup>c</sup>	68.2±3.9	-
<b>7-MEOTA</b>	-	-	-	13500±900	6400±420	2.1
<b>Tacrine</b>	-	-	-	424±21	45.8±3.0	9.2
<b>Ac. férulique</b>	-	-	-	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Les courbes d'inhibitions ont été obtenues par régression non linéaire. Chaque  $IC_{50}$  est la moyenne ± SEM d'au moins 3 différentes expériences. <sup>b</sup>Ratio  $IC_{50}(hAChE)/IC_{50}(hBuChE)$ . <sup>c</sup>Pourcentage d'inhibition à 3  $\mu$ M.

<sup>d</sup>Pas actif.

L'hybride **B11** possédant un linker octaméthylène et un motif 2'-naphtyle, est le meilleur inhibiteur de la hBuChE ( $IC_{50}$ = 0.260 nM). Pour la même longueur de linker, les hybrides **B1-B5** avec le motif 2'-chloro-6'-méthylpényle, sont de meilleurs inhibiteurs de la hBuChE que ceux possédant un groupement benzyle (**B6-B8**) et naphtyle (**B9-B10**), à l'exception du composé **B11**.

Si l'on se penche maintenant sur l'influence de la taille du linker sur l'activité pour les hybrides **B6-B8** et **B9-B11**, nous constatons que l'inhibition de la hBuChE augmente de n= 6 à n= 8. Concernant les hybrides **B1-B5**, le meilleur inhibiteur de hBuChE est l'hybride **B3** avec un linker heptaméthylène ( $IC_{50}$ = 0.307 nM). L' $IC_{50}$  se stabilise autour de 0.32 nM, du linker n= 7 à n= 9.

Concernant l'inhibition de l'hAChE, le composé le plus actif est l'hybride **B5** ( $IC_{50}$ = 14.3 nM, 30 fois plus actif que la tacrine, 944 fois plus actif que la 7-MEOTA). Nous observons

l'influence de la taille du linker sur les hybrides **B2-B5** ou l'on constate que la valeur de l' $IC_{50}$  diminue avec l'augmentation de la longueur du linker, de  $n=6$  à  $n=9$ . Il est de même pour les séries **B6-B8** et **B9-B11**, de  $n=6$  à  $n=8$ .

En se basant uniquement sur les valeurs d'inhibition des cholinestérases humaines, nous avons identifié l'hybride **B5** comme étant l'inhibiteur le mieux équilibré (meilleure inhibition en hACHE et excellente inhibition en hBuChE). Cependant, en tenant compte des résultats sur la toxicité *in vitro* des cellules HepG2, l'hybride **B8** présente un meilleur profil. Nous avons effectué par la suite l'étude du mode d'inhibition de l'hybride **B8**.

### III.2.5.3 Cinétique enzymatique: mode d'inhibition de l'hybride **B8** sur l'hACHE

La description du mode d'inhibition de l'hybride **B8** sur l'hACHE a été effectuée en construisant un diagramme en double inverse de Lineweaver-Burk à différentes concentrations en substrat (0.11-0.56 mM) acétylthiocholine (ATCh) et en inhibiteur **B8** (12.5, 20, 40 et 100 nM).<sup>326</sup> Les différentes vitesses ont été déterminées en mesurant l'augmentation de l'absorbance pendant 210 s par spectrophotométrie UV à 412 nm.

Pour commencer, considérons l'interaction simple entre une enzyme et son substrat (Schéma III.19) :

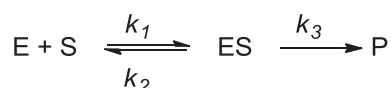


Schéma III.20. Interaction entre une enzyme et son substrat.

E étant l'enzyme libre, S : le substrat, ES : le complexe enzyme-substrat,  $k_1$  : la vitesse de formation du complexe ES,  $k_2$  : la vitesse de dissociation du complexe ES,  $k_3$  : la vitesse de formation du produit et P : le produit.

On définit alors une constante de dissociation, appelée constante de Michaelis  $K_m$  par :

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Equation III.2. Définition de la constante de Michaelis.

L'équation générale de Michaelis-Menten définissant cet échange s'écrit alors comme suit :

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Equation III.3. Equation générale de Michaelis-Menten.

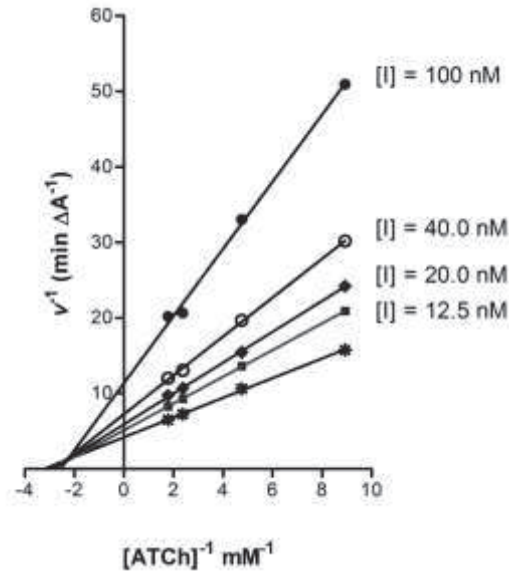
Où  $V$  représente la vitesse initiale de la réaction enzymatique déterminée expérimentalement,  $V_{\max}$  : la vitesse initiale maximale, mesurée pour une concentration saturante en substrat,  $[S]$  : la concentration en substrat et  $K_m$  : la constante de Michaelis spécifique à l'enzyme. La linéarisation en double inverse s'écrit alors :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \left[ \frac{1}{V_{\max}} \right]$$

Equation III.4. Linéarisation de Lineweaver-Burk.

On obtient ainsi une équation de droite affine dont la pente est égale à  $K_m/V_{\max}$  et l'ordonnée à l'origine égale à  $1/V_{\max}$ . Cette équation permet de connaître les constantes  $K_m$  et  $V_{\max}$  d'une enzyme en l'absence de l'inhibiteur.

Dans notre cas, lorsque l'on ajoute l'inhibiteur **B8** à différentes concentrations et traçons le diagramme de Lineweaver-Burk, nous remarquons que les pentes des différentes droites augmentent ainsi que les ordonnées à l'origine. L'intersection des différentes droites avec l'abscisse indique que l'hybride **B8** peut se lier à la fois à l'enzyme libre mais aussi au complexe enzyme-substrat. De ce fait, le composé **B8** se comporte comme un inhibiteur non compétitif mixte de l'hAChE (Graphique III.2).



Graphique III.2. Diagramme de Lineweaver-Burk du composé **B8**,  $r^2 > 0.99$  pour toutes droites.

Dès lors, il faut considérer les échanges suivants pour l'inhibiteur **B8** (Schéma III.21) :

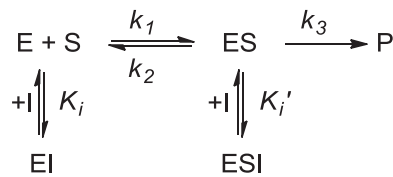


Schéma III.21. Inhibition non compétitive mixte.

Où E et S, représentent respectivement l'enzyme libre et le substrat, I : l'inhibiteur réversible, ES : le complexe enzyme-substrat, EI : le complexe enzyme-inhibiteur, ESI : le complexe enzyme-substrat-inhibiteur et P : le produit. Différentes constantes de dissociations  $K_i$  et  $K'_i$  sont alors associées à ces échanges et sont définies comme suit :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Equation III.5. Constante de dissociation  $K_i$ .

$$K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Equation III.6. Constante de dissociation  $K'_i$ .

$K_i$  représente la constante de dissociation enzyme-substrat et  $K'_i$ , la constante de dissociation enzyme-substrat-inhibiteur. Dans le cas présent, nous assumons aussi que ni le complexe enzyme-inhibiteur (EI) ni le complexe enzyme-substrat-inhibiteur (ESI) n'interagissent entre eux pour former le produit.

### Chapitre III : Travaux personnels

Dans le cas d'une inhibition non compétitive mixte, l'équation de Michaelis-Menten s'écrit ainsi :

$$V = \frac{\frac{V_{\max}[S]}{\alpha'}}{[S] + K_m \frac{\alpha}{\alpha'}} = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \text{ avec } \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \text{ et } \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$$

Equation III.7. Equation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition non compétitive mixte.

On définit alors  $K_m^{\text{app}}$  et  $V_{\max}^{\text{app}}$  comme suit :

$$K_m^{\text{app}} = \frac{\alpha}{\alpha'} \times K_m$$

Equation III.8. Définition de  $K_m^{\text{app}}$ .

$$V_{\max}^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{\alpha'}$$

Equation III.9. Définition de  $V_{\max}^{\text{app}}$ .

Où  $K_m^{\text{app}}$  représente la constante apparente de Michaelis et  $V_{\max}^{\text{app}}$ , la vitesse initiale maximale apparente. Cela veut dire qu'à chaque concentration en inhibiteur correspond une valeur propre de  $K_m^{\text{app}}$  et  $V_{\max}^{\text{app}}$ .

Dès lors, l'équation de Michaelis-Menten peut être réécrite de la façon suivante :

$$V = V_{\max}^{\text{app}} \times \frac{[S]}{K_m^{\text{app}} + [S]}$$

Equation III.10. Equation de Michaelis-Menten en fonction de  $K_m^{\text{app}}$  et  $V_{\max}^{\text{app}}$ .

La linéarisation de Lineweaver-Burk nous donne :

$$\frac{1}{V} = \frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

Equation III.11. Linéarisation de Lineweaver-Burk pour une inhibition non compétitive mixte.

Avec la pente,  $\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}$  et l'ordonnée à l'origine,  $\frac{\alpha'}{V_{\max}}$ . La droite coupe l'abscisse à  $-\frac{\alpha'}{\alpha K_m}$ .

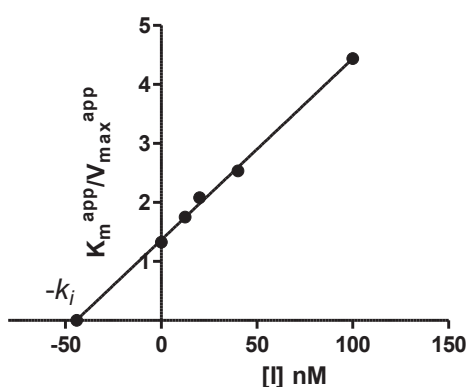
Le tableau III.9 regroupe les différentes données récoltées graphiquement grâce au diagramme de Lineweaver-Burk du composé **B8** :

Tableau III.9. Données relatives au diagramme de Lineweaver-Burk du composé **B8**.

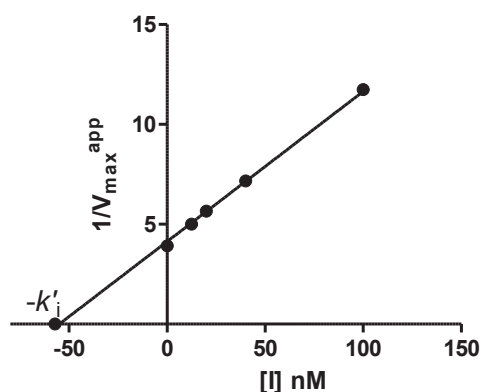
[I] (nM)	$V_{\max}^{\text{app}}$	$K_m^{\text{app}}$	$\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}$	$-\frac{\alpha'}{\alpha K_m}$	$\frac{\alpha'}{V_{\max}}$
0 (Contrôle) <sup>a</sup>	0.2556	0.3396	1.3285	-2.9449	3.9130
12.5	0.2	0.3502	1.7512	-2.8552	5
20	0.1769	0.3685	2.0832	-2.7136	5.6522
40	0.1394	0.3535	2.5361	-2.8286	7.1739
100	0.0852	0.3781	4.4382	-2.6446	11.7391

<sup>a</sup>Pour le contrôle (sans inhibiteur),  $\alpha = \alpha' = 1$ , donc  $K_m^{\text{app}} = K_m$  et  $V_{\max}^{\text{app}} = V_{\max}$ .

Par la suite, nous avons déterminé graphiquement les valeurs de  $K_i$  et  $K'_i$ . Ainsi, en traçant  $K_m^{\text{app}}/V_{\max}^{\text{app}}$  en fonction de la concentration en inhibiteur, l'intersection de la droite sur l'abscisse fournit  $-K_i$ . Nous trouvons alors un  $K_i$  de 44.1 nM (Graphique III.3). Pour  $K'_i$ , la droite affine  $1/V_{\max}^{\text{app}}$  en fonction de la concentration en inhibiteur coupe l'abscisse à  $-K'_i$ . On obtient alors un  $K'_i$  de 57.2 nM (Graphique III.4).



Graphique III.3. Détermination de  $K_i$ ,  $r^2 = 0.996$ .



Graphique III.4. Détermination de  $K'_i$ ,  $r^2 = 0.999$ .

### III.2.6 Evaluation de la neuroprotection

L'effet neuroprotecteur des cinq composés les moins hépatotoxiques **B1**, **B5**, **B8**, **B13** et **B14** a été évalué sur la lignée cellulaire de neuroblastomes humain SH-SY5Y grâce au test MTT décrit précédemment (cf. Chap. III, III.2.4.2.).

Dans un premier temps, nous avons déterminé la viabilité cellulaire directe des neuroblastomes SH-SY5Y en présence des hybrides sélectionnés. Dans un second temps, nous avons évalué la neuroprotection induite par ces composés sur ces cellules en présence de différents initiateurs de stress oxydants tels que les peptides A $\beta$ <sub>1-40</sub>/A $\beta$ <sub>1-42</sub>, le peroxyde d'hydrogène et un mélange d'oligomycine A/roténone (O/R).

### III.2.7 Viabilité des neuroblastomes SH-SY5Y seules

Les cellules SH-SY5Y sont souvent utilisées comme modèle *in vitro* de la fonction neuronale.<sup>327,328</sup> Le tableau III.10 regroupe les résultats obtenus pour les hybrides **B1**, **B5**, **B8**, **B13** et **B14** à 1, 3 et 10  $\mu$ M. Les hybrides **B1** et **B14** se sont révélés être non toxiques pour toutes les concentrations testées alors que les hybrides **B5**, **B8** et **B13** ont montré une toxicité modérée à forte à 3 et 10  $\mu$ M, respectivement.

Tableau III.10. Viabilité <i>in vitro</i> des cellules SH-SY5Y en présence des composés <b>B1</b> , <b>B5</b> , <b>B8</b> , <b>B13</b> et <b>B14</b> . <sup>a</sup>			
Hybride	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M
<b>B1</b>	99.9 $\pm$ 6.7 <sup>ns</sup>	100.2 $\pm$ 5.5 <sup>ns</sup>	90.8 $\pm$ 1.6 <sup>ns</sup>
<b>B5</b>	94.6 $\pm$ 5.2 <sup>ns</sup>	85.5 $\pm$ 5.8 <sup>ns</sup>	10.0 $\pm$ 3.5***
<b>B8</b>	91.7 $\pm$ 0.6 <sup>ns</sup>	81.6 $\pm$ 4.3*	9.9 $\pm$ 2.6***
<b>B13</b>	99.7 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>	79.4 $\pm$ 4.7**	40.1 $\pm$ 1.9***
<b>B14</b>	98.9 $\pm$ 0.9 <sup>ns</sup>	97.5 $\pm$ 1.2 <sup>ns</sup>	95.1 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>

<sup>a</sup>Tous les hybrides ont été incubés pendant 24h. Données exprimées en % de neuroprotection  $\pm$  SEM de triplicat d'au moins 5 différentes cultures \*\*\*P $\leq$  0.001, \*\*P $\leq$  0.01. ns: non significative en comparaison avec le groupe contrôle.



### III.2.8 Viabilité des neuroblastomes SH-SY5Y en présence d'initiateurs de stress oxydant

Les tests de neuroprotection en présence d'initiateurs de stress oxydant ont été effectués à 0.3 et 1  $\mu\text{M}$  pour les hybrides **B1**, **B5** et **B8** ; à 1  $\mu\text{M}$  pour l'hybride **B13** ; à 1 et 3  $\mu\text{M}$  pour l'hybride **B14**.

Les initiateurs de stress oxydant suivant ont été utilisés :

- Les peptides  $\text{A}\beta_{1-40}$  et  $\text{A}\beta_{1-42}$  : Ceux-ci sont impliqués dans les voies de signalisations en relation avec le phénomène d'apoptose (NF- $\kappa\text{B}$ , ERK/p38 MAPK, JNK) et dans la production de ROS.<sup>329</sup>
- Le peroxyde d'hydrogène pour la génération de radicaux libres exogènes.
- Un mélange oligomycine A/roténone (O/R) : Ces molécules sont connues pour être des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale et participent à la production de ROS en entravant respectivement les complexes V et I de la chaîne de transport des électrons.<sup>330</sup>

Le tableau III.11 résume les résultats obtenus. L'hybride **B13** a montré une faible neuroprotection contre le peroxyde d'hydrogène et le mélange oligomycine A/roténone à 1  $\mu\text{M}$ . Cependant, il s'est révélé être très neuroprotecteur contre le peptide  $\text{A}\beta_{1-42}$  (80.2%) et a un effet modéré contre le peptide  $\text{A}\beta_{1-40}$  (42.0%). En comparaison avec l'hybride **B13**, il est intéressant de noter qu'à 1  $\mu\text{M}$ , l'hybride **B14** a montré un effet inverse sur la toxicité induite par les peptides  $\text{A}\beta$  ( $\text{A}\beta_{1-40}$ : 74.7%,  $\text{A}\beta_{1-42}$ : 46.3%) tout en présentant une neuroprotection modérée contre le peroxyde d'hydrogène (52.7%) et le mélange oligomycine A/roténone (40.0%).

Nous constatons qu'à 3  $\mu\text{M}$ , la neuroprotection induite par le composé **B14** contre le peroxyde d'hydrogène et le mélange oligomycine A/roténone est réduite pratiquement de

moitié, passant de 40.0% à 21.9%. Nous remarquons également que **B14** est meilleur neuroprotecteur contre le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> à cette même concentration (59.7%).

Tableau III.11. Effet neuroprotecteur des hybrides **B1**, **B5**, **B8**, **B13** et **B14** sur la mort cellulaire des cellules SH-5YSY induite par A $\beta$ <sub>1-40</sub> (30  $\mu$ M), A $\beta$ <sub>1-42</sub> (30  $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300  $\mu$ M), ou oligomycine A (10  $\mu$ M)/rotenone (30  $\mu$ M).<sup>a</sup>

Hybride (concentration)	A $\beta$ <sub>1-40</sub>	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O/R
<b>B1</b> (0.3 $\mu$ M)	n.d.	24.7 $\pm$ 3.6*	n.d.	22.3 $\pm$ 2.9**
<b>B1</b> (1 $\mu$ M)	n.d.	52.3 $\pm$ 4.2***	76.6 $\pm$ 1.5***	30.5 $\pm$ 1.6**
<b>B5</b> (0.3 $\mu$ M)	n.d.	38.1 $\pm$ 2.0**	n.d.	39.9 $\pm$ 1.4***
<b>B5</b> (1 $\mu$ M)	n.d.	57.2 $\pm$ 3.9***	57.4 $\pm$ 2.8***	30.1 $\pm$ 0.7**
<b>B8</b> (0.3 $\mu$ M)	n.d.	16.4 $\pm$ 1.7*	n.d.	37.3 $\pm$ 2.0***
<b>B8</b> (1 $\mu$ M)	n.d.	65.4 $\pm$ 3.8***	56.8 $\pm$ 3.3***	30.6 $\pm$ 0.6**
<b>B13</b> (1 $\mu$ M)	42.0 $\pm$ 1.4*	80.2 $\pm$ 4.2***	2.3 $\pm$ 3.8 <sup>ns</sup>	15.2 $\pm$ 2.3 <sup>ns</sup>
<b>B14</b> (1 $\mu$ M)	74.7 $\pm$ 1.2***	46.3 $\pm$ 4.9*	52.7 $\pm$ 6.2*	40.0 $\pm$ 2.0*
<b>B14</b> (3 $\mu$ M)	49.8 $\pm$ 2.4**	59.7 $\pm$ 4.2**	19.9 $\pm$ 3.6 <sup>ns</sup>	21.9 $\pm$ 1.6 <sup>ns</sup>

<sup>a</sup>Données exprimées en % de neuroprotection  $\pm$  SEM de triplicat d'au moins 4 différentes cultures. \*\*\*P $\leq$ 0.001, \*\*P $\leq$ 0.01, \*P $\leq$ 0.05, ns: non significative en comparaison avec contrôle. O/R: oligomycine A/rotenone, n.d.: non déterminée.

Pour les hybrides **B5** et **B8**, à 0.3  $\mu$ M, l'effet neuroprotecteur est réduit contre le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> (**B5** : 38.1%, **B8** : 16.4%) mais augmente contre l'oligomycine A/rotenone (**B5** : 39.9%, **B8** : 37.3%). Globalement à 1  $\mu$ M, ces composés ont montré une neuroprotection modérée contre le stress oxydant induit par l'oligomycine A/rotenone (de 15.2% à 40.0%), une neuroprotection modérée à bonne contre la toxicité induite par le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> (de 46.2% à 80.2%) et une neuroprotection faible à bonne contre la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (de 2.3% à 76.6%).

### III.2.9 Evaluation de la capacité antioxydante

Les capacités antioxydantes des hybrides de la série **B** a été évaluée grâce au test ORAC-FL (*Oxygen Radical Absorbance Capacity By Fluorescence*).<sup>331,332</sup>

#### III.2.9.1 Le test ORAC-FL

Le test ORAC-FL est un test antioxydant très utilisé par les chercheurs.<sup>333,334</sup> Il permet de déterminer la capacité d'un composé à réduire les radicaux peroxy. Il utilise la fluorescéine

comme sonde fluorescente, l'AAPH (chlorure de 2,2'-azobis(2-amidinopropane)) comme initiateur radicalaire et le trolox comme référence standard. Par convention, le trolox a un index ORAC égale à 1 et les résultats sont toujours rapportés en équivalents trolox.

L'AAPH, en se décomposant par la chaleur, libère des radicaux qui réagissent avec la fluorescéine. Celle-ci se dégrade alors progressivement. Nous pouvons ainsi suivre cette dégradation au cours du temps en mesurant la fluorescence à  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ . (Schéma III.22).

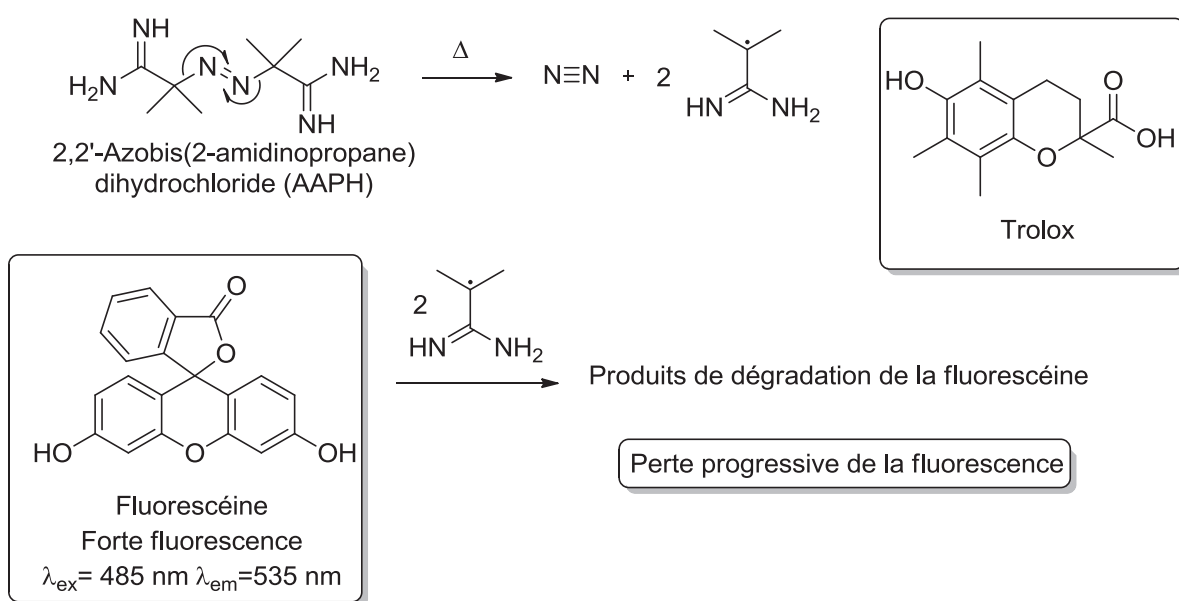


Schéma III.22. Principe du test ORAC-FL.

Cependant, en présence d'un composé ayant des propriétés antioxydantes, cette dégradation est ralentie. Nous pouvons alors déterminer le pouvoir antioxydant d'un composé en traçant les courbes de fluorescence en fonction du temps à différentes concentrations en antioxydant. Les courbes de chaque concentration sont par la suite normalisées par rapport à la courbe sans antioxydant (blanc) puis l'aire sous la courbe de chaque concentration (AUC : *area under the curve decay*) est calculée pour une durée de 60 minutes comme suit :

$$AUC = \sum_{i=0}^{i=60} f_i / f_0$$

Equation III.12. Aire sous la courbe (AUC).

Où  $f_0$  est la lecture de fluorescence initiale à 0 minutes et  $f_i$  est la valeur de fluorescence au temps  $i$ . L'AUC net correspondant à l'échantillon analysé est calculé comme suit :  $AUC_{net} = AUC_{antioxydant} - AUC_{blanc}$ .

En construisant la droite affine AUC net en fonction de la concentration en antioxydant puis en divisant la pente obtenue pour l'antioxydant par la pente obtenue pour la régression linéaire du trolox obtenu lors du même essai, nous obtenons la valeur de l'index ORAC de l'antioxydant testé :

$$ORAC = \frac{Pente (antioxydant)}{Pente (trolox)}$$

Equation III.13. Détermination de l'index ORAC.

#### III.2.9.2 Résultats

Nous avons pris l'acide férulique (index ORAC= 3.74) comme référence. De manière générale, nous constatons que tous les hybrides de la série **B** présentent de bons index ORAC (Tableau III.12), globalement supérieurs à l'acide férulique, avec des valeurs allant de 3.43 (hybride **B9**) à 7.74 (hybride **B2**). Les composés **B9-B11** avec un motif 2'-naphtyle sont les moins bons antioxydants avec des valeurs autour de 3.5.

En ce qui concerne les dérivés comportant un fragment 7-MEOTA (**B12-B14**) avec la même longueur de linker, le composé **B13** (6.47) a montré une meilleure activité antioxydante que les hybrides **B12** (4.79) et **B14** (4.29).

Tableau III.12. Index ORAC des hybrides de la série B.<sup>a</sup>

Hybride	Index ORAC	Hybride	Index ORAC
<b>B1</b>	6.89±0.08	<b>B9</b>	3.43±0.16
<b>B2</b>	7.74±0.26	<b>B10</b>	3.57±0.11
<b>B3</b>	6.40±0.47	<b>B11</b>	3.44±0.09
<b>B4</b>	5.29±0.16	<b>B12</b>	4.79±0.39
<b>B5</b>	4.41±0.04	<b>B13</b>	6.47±0.10
<b>B6</b>	5.75±0.32	<b>B14</b>	4.29±0.19
<b>B7</b>	7.04±0.24	<b>Acide férulique</b>	3.74±0.22
<b>B8</b>	6.40±0.47	<b>Trolox</b>	1

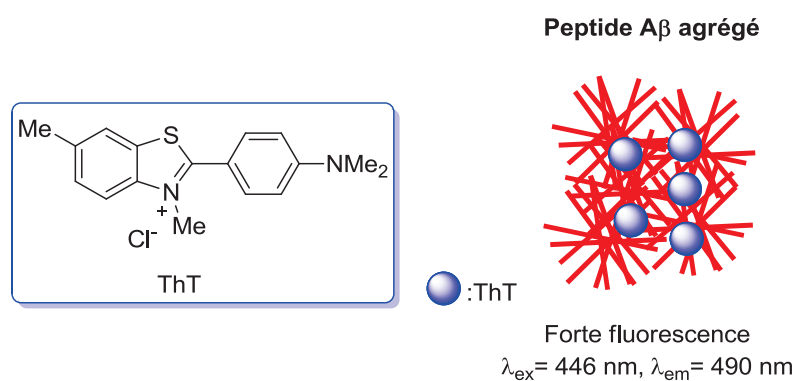
<sup>a</sup>Données exprimées en équivalents trolox. Moyennes ± SD de trois essais consécutifs.

### III.2.10 Evaluation de l'inhibition de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$

#### III.2.10.1 Généralités

L'activité inhibitrice des hybrides sur l'agrégation spontanée du peptide A $\beta_{1-42}$  a été déterminée *in vitro* en utilisant un test fluorimétrique basé sur l'utilisation de la thioflavine T (ThT).<sup>335</sup> La thioflavine T est un sel de benzothiazole qui permet de visualiser et de quantifier la présence ou la formation d'agrégats de peptide A $\beta$ . Le ThT possède une forte affinité pour ces agrégats, ce qui se traduit par une forte fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}}$ = 446 nm et  $\lambda_{\text{em}}$ = 490 nm).

Ainsi, plus un composé va inhiber l'auto-agrégation du peptide A $\beta_{1-42}$ , moins la fluorescence sera intense. On peut alors déterminer le pourcentage d'inhibition à une concentration donnée d'inhibiteur par rapport au groupe contrôle (Schéma III.23).

Schéma III.23. Affinité du ThT pour le peptide A $\beta$  agrégé.

## III.2.10.2 Résultats

Le tableau III.13 regroupe les résultats d'inhibition. Nous remarquons que tous les hybrides de la série **B** présente de bonnes inhibitions de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> avec des pourcentages d'inhibition allant de 50.1% à 80.8% quand ils sont testés à concentration équimolaire avec le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> ([A $\beta$ <sub>1-42</sub>]=[Inhibiteur]= 50  $\mu$ M). Cette étude confirme bien que ces hybrides sont capables d'inhiber directement la formation d'espèces toxiques d'A $\beta$ . Nous pouvons également noter que la tacrine et la 7-MEOTA n'ont pas d'effet sur l'agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> (<5% d'inhibition).

Tableau III.13. Pourcentages d'inhibition de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> par les hybrides de la série **B**.<sup>a</sup>

Hybride	Auto-agrégation A $\beta$ <sub>1-42</sub>	Hybride	Auto-agrégation A $\beta$ <sub>1-42</sub>
<b>B1</b>	73.5 $\pm$ 0.2	<b>B9</b>	72.0 $\pm$ 0.3
<b>B2</b>	50.1 $\pm$ 2.8	<b>B10</b>	69.0 $\pm$ 1.5
<b>B3</b>	75.0 $\pm$ 1.1	<b>B11</b>	73.0 $\pm$ 1.5
<b>B4</b>	76.7 $\pm$ 0.8	<b>B12</b>	72.4 $\pm$ 1.3
<b>B5</b>	80.8 $\pm$ 1.5	<b>B13</b>	72.1 $\pm$ 3.2
<b>B6</b>	67.9 $\pm$ 4.2	<b>B14</b>	65.6 $\pm$ 0.9
<b>B7</b>	75.0 $\pm$ 1.2	<b>7-MEOTA</b>	<5%
<b>B8</b>	69.3 $\pm$ 3.5	<b>Tacrine</b>	<5%

<sup>a</sup>Données exprimées en pourcentages d'inhibition, [A $\beta$ <sub>1-42</sub>]=[Inhibiteur]= 50  $\mu$ M.

De cette expérimentation, nous avons identifié le composé **B5** comme étant le plus puissant inhibiteur de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> de la série **B** (80.8%). Les dérivés comportant un motif 7-MEOTA, les hybrides **B12** et **B14**, ont également montré de bons résultats (autour de 72%) mais globalement, aucune relation structure-activité claire n'a pu être dressée.

### III.2.11 Modélisation Moléculaire

#### III.2.11.1 Introduction

De nos jours, la découverte et l'optimisation de nouvelles molécules bioactives repose en parti sur l'utilisation d'outils de modélisation moléculaire assisté par ordinateur. Ces méthodes *in silico* permettent, entre autres, de simuler et de décrire l'affinité d'une entité moléculaire pour une protéine donnée (docking)<sup>336</sup> ou bien encore, de prédire des propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques (analyse *in silico* ADMET).<sup>337</sup>

#### III.2.11.2 Docking des hybrides **B5** et **B8**

Nous avons effectué le docking des hybrides **B5** (le composé le plus actif en hAChE et meilleur inhibiteur de l'agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>) et **B8** (le composé le plus actif de la série **B6-B8**, ayant de bonnes propriétés antioxydantes et anticholinestérasiques et moins toxique que la tacrine) dans les cholinestérasas humaines (hAChE, PDB ID : 4EYT<sup>338</sup> et hBuChE, PDB ID : 4BDS<sup>339</sup>). Le logiciel Autodock 4.2 a été utilisé.<sup>340</sup>

- Acétylcholinestérase humaine (hAChE)

Les hybrides **B5** et **B8** se retrouve au cœur de la triade catalytique Ser203, His447 et Glu334 de l'hAChE. Ils sont orientés le long de la gorge menant au site actif, s'étendant du site catalytique anionique (CAS) situé au fond de la gorge hydrophobe jusqu'au site périphérique anionique (PAS) près de l'entrée de la gorge en établissant des interactions hydrophobes avec différents résidus aromatiques. Plus spécifiquement, le fragment tacrine forme des interactions cation- $\pi$  avec Trp86 (le site d'interaction de l'acétylcholine) et Tyr337. La forme protonée de la partie tacrine établie, quant à elle, une liaison hydrogène avec le carbonyle de His447. A l'entrée de la gorge, les noyaux 2'-chloro-6'-méthylphényle (hybride **B5**) ou benzyle (hybride **B8**) forment une interaction d'empilement  $\pi$ - $\pi$  avec Tyr72, un résidu clé dans le PAS de l'hAChE.

De plus, pour hybride **B5**, la présence du substituant électroattracteur chloro- sur le noyau phényle renforce cette interaction  $\pi$ - $\pi$ . Par ailleurs, le fragment féruloyle du squelette  $\alpha$ -acylaminocarboxamide établi une liaison hydrogène avec Ser293 et interagit au niveau du PAS avec le noyau aromatique de Trp286.

Nous avons vu au premier chapitre, dans la description de l'hAChE, que la gorge séparant le CAS du PAS était longue d'environ 20 Å. En mesurant la longueur des conformations étendues des hybrides **B5** et **B8**, nous trouvons des valeurs de 21.2 et 20.8 Å, respectivement, du motif tacrine jusqu'au bout du fragment féruloyle. Cela démontre bien que ces composés peuvent bien couvrir à la fois le CAS et PAS et être ainsi considérés comme des hybrides pouvant se lier aux deux sites d'interaction de l'hAChE (*dual binding site inhibitors*) (Figure III.4).

Finalement, le linker diaminoalkyle remplit une poche hydrophobe délimitée par les noyaux phényles de Tyr121, Phe297, Tyr341, alors que le groupement amine est engagé dans des interactions polaires avec Gly120 et Gly121.

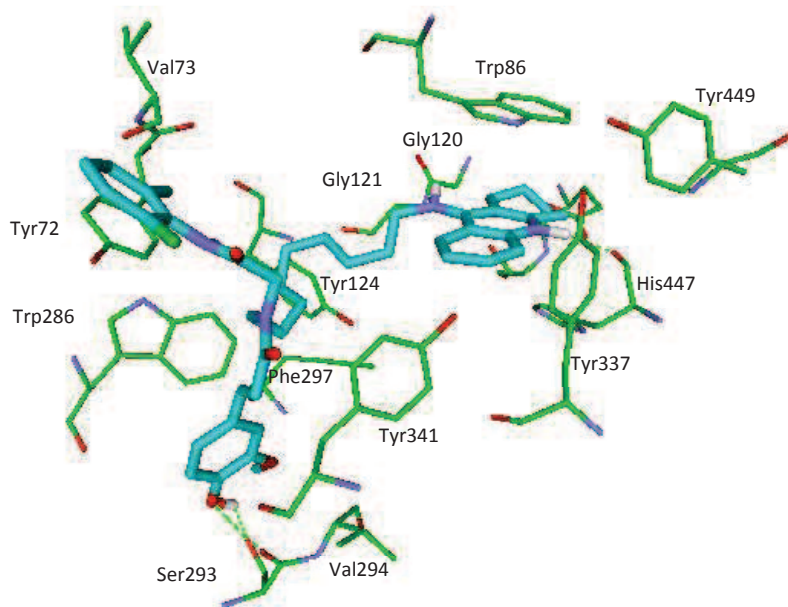


Figure III.4. Représentation du mode d'interaction de l'hybride **B5** (en cyan) avec l'hAChE (Autodock 4.2).

Pour confirmer la robustesse de la modélisation précédente nous avons refait le docking de **B5** sur l'hAChE en utilisant un autre programme de modélisation moléculaire, Gold



v5.2,<sup>341</sup> et en prenant en compte la présence de molécules d'eau dans le site actif de l'hAChE.<sup>342</sup> Ainsi, les molécules d'eau peuvent modifier les modes d'interactions et il nous a semblé intéressant de les explorer.

La pose présentée dans la figure III.5 de l'hybride **B5** montre que le fragment tacrine se situe dans le CAS de l'hAChE et établit une liaison hydrogène, longue de 2.8 Å, avec Ser203. Le linker remplit la gorge hydrophobe et le squelette  $\alpha$ -acylaminocarboxamide se situe au niveau du PAS de l'hAChE. A l'entrée de l'hAChE, le fragment féruloyle est stabilisé par une interaction  $\sigma$ - $\pi$ , longue de 2.8 Å, avec le système  $\pi$  de His287. Comme nous pouvons le voir grâce à la représentation de surface de l'hAChE, le motif féruloyle s'intègre parfaitement dans le PAS de l'hAChE. Cela est dû à la présence des molécules d'eau qui force le motif tacrine à adopter une nouvelle orientation en comparaison avec la pose sans molécules d'eau. De plus, le linker adopte une orientation plus linéaire.

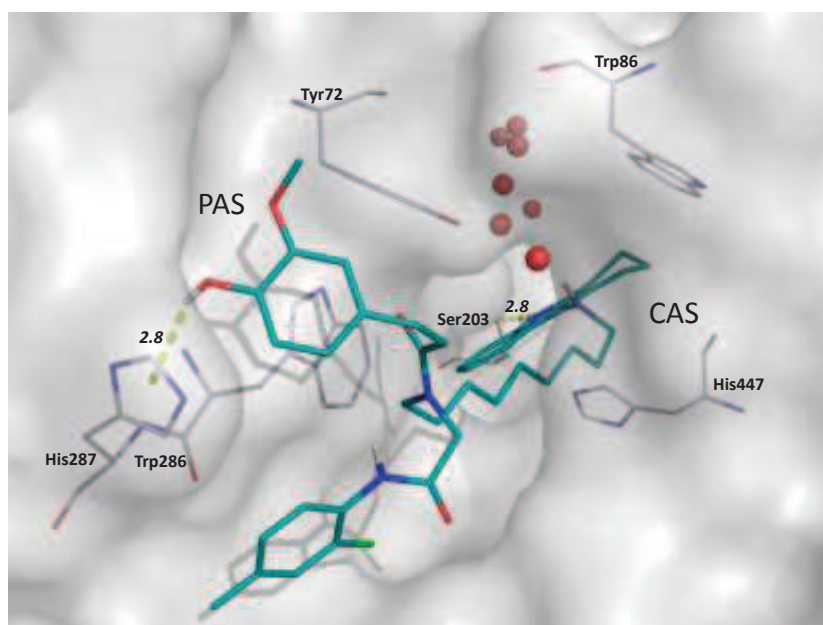


Figure III.5. Représentation du mode d'interaction de l'hybride **B5** avec l'hAChE en présence de molécules d'eau en rouge, représentation surfacique de l'hAChE en gris (Gold v5.2). Distances données en Å et ont été mesurées grâce au logiciel PyMOL.<sup>343</sup>

- Butyrylcholinestérase humaine (hBuChE)

Le mode d'interaction du composé **B5** avec la structure de la hBuChE est présenté dans la figure III.6. Nous notons en premier lieu que le motif tacrine forme une interaction  $\pi$ - $\pi$  avec le noyau aromatique de Trp82 et His438. L'atome d'azote protoné du noyau tétrahydroacridine (tacrine) forme, quant à lui, une liaison hydrogène avec His438. D'autres interactions hydrophobes sont créées avec Trp430, Tyr440, Met437 et Gly439. Cette disposition dans le site actif est la même que celle adoptée par la tacrine co-cristallisée expérimentalement dans la hBuChE.<sup>339</sup>

Le fragment hydrophobe 2'-chloro-6'-methylphenyle se retrouve dans une poche constituée de Pro285, Thr284, Ala328 et Gly283. De plus, le sous-fragment méthoxyphénol du motif féruloyle forme une interaction  $\pi$ - $\pi$  avec Phe329, alors que les groupements hydroxyle et méthoxyle forment des liaisons hydrogènes avec la chaîne latérale de Ser198 et la chaîne principale de Gly117, respectivement. Ce même fragment méthoxyle forme aussi des interactions  $\sigma$ - $\pi$  avec Trp231 et d'autres interactions hydrophobes avec Phe398 et Val288. Des interactions polaires sont également observées avec Thr284, Pro285 et Ser287. Quant au linker, celui-ci forme des interactions à la fois hydrophobes (chaîne alkyle) et polaires (groupement amine) avec Ile69, Asn83, Gly116, Thr120, Asp70 et Tyr332. Pour l'hybride **B8**, des interactions similaires apparaissent.

Cependant, la grande flexibilité de ces hybrides permet la génération d'interactions d'empilement  $\pi$ - $\pi$  faisant intervenir à chaque fois un noyau aromatique différent (fragment féruloyle, benzyle, 2'-chloro-6'-methylphenyle). Ainsi, le conformère de **B8** ayant l'énergie d'interaction la plus basse forme des interactions d'empilement  $\pi$ - $\pi$  avec Phe329 par le biais de son fragment benzyle. De façon similaire, le sous-fragment méthoxyphénol de l'hybride **B5** forme une interaction  $\sigma$ - $\pi$  avec Ser287 et une liaison hydrogène avec Asn289.

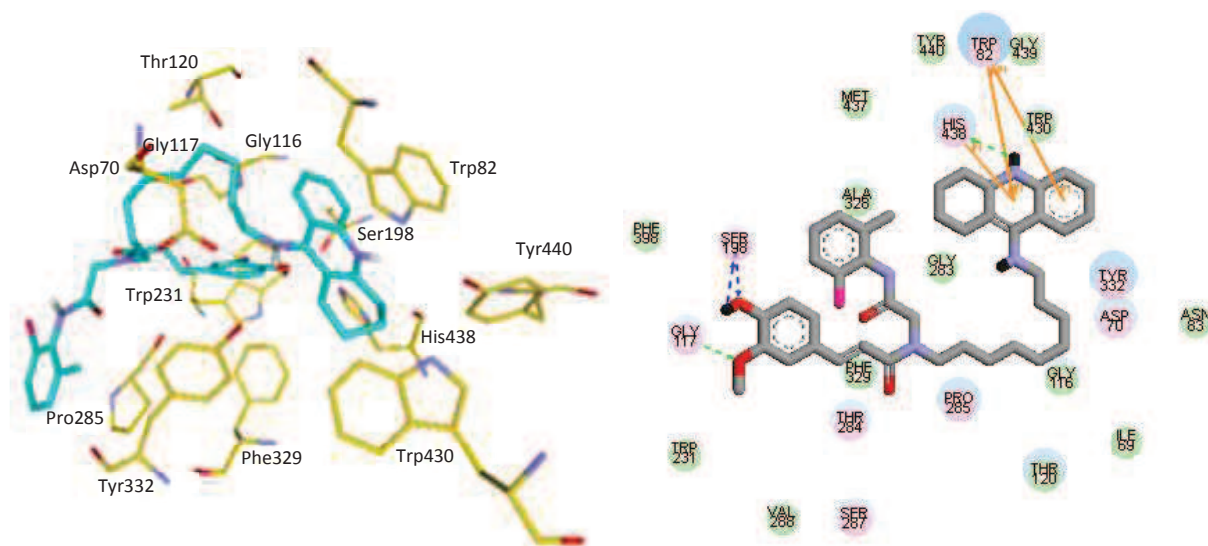


Figure III.6. A gauche: représentation du mode d'interaction du composé **B5** (en cyan) avec la hBuChE (Autodock 4.2). A droite : diagramme 2D des interactions ligand-enzyme (Les résidus principaux interagissant avec la molécule sont dessinés avec des lignes oranges, les liaisons hydrogène, donneur et accepteur, sont respectivement représentés par des lignes bleues et vertes).

### III.2.11.3 Prédiction *in silico* des propriétés ADMET

L'acronyme ADMET (appelée aussi ADME-Tox) correspond à quatre paramètres pharmacocinétiques : l'absorption, la distribution, la métabolisation, l'excrétion et un paramètre pharmacodynamique, la toxicité. Les propriétés ADMET permettent de décrire le devenir et l'action toxicologique d'une molécule bioactive présente dans un médicament après administration dans un organisme donnée. Ils apportent des informations cruciales permettant de choisir par la suite le dosage, les voies d'administration et la forme galénique du médicament.

De nos jours, dans l'industrie pharmaceutique, l'établissement de profils ADMET pour des candidats médicament « chefs de file » est intégré très tôt dans le processus de développement. Ces profils sont habituellement effectués *in vitro* ou *in vivo*.<sup>344</sup> Alternativement, une approche préliminaire peut être suivie en étudiant ces propriétés *in silico*.<sup>345</sup> Cette approche présente plusieurs avantages, comme un gain de temps et des coûts d'évaluation réduits.

Nous définissons à présent succinctement ces cinq paramètres :

- **L'absorption** : Une fois la substance active libérée de son enveloppe galénique, celle-ci doit pouvoir atteindre sa cible. Pour cela, elle doit tout d'abord passer dans le sang en franchissant différentes membranes biologiques perméables et souvent lipophiles comme les parois du tube digestif (comprimés), la paroi des poumons (sprays), ou la peau (pommades). Les injections intraveineuses permettent, quant à elle, un passage direct dans le sang. La biodisponibilité est le paramètre pharmacocinétique en relation avec la phase d'absorption et qui permet de connaître la proportion de principe actif administrée présente dans la circulation sanguine.
- **La distribution** : La molécule est maintenant dans le sang. Elle se lie alors, plus ou moins fortement, à différentes protéines plasmatiques (albumine, glycoprotéines, lipoprotéines). Elle est alors présente sous une forme libre et une forme liée. La forme libre va pouvoir effectuer son action pharmacologique alors que la forme liée est libérée plus progressivement. La molécule, selon ses propriétés physico-chimiques et biochimiques, peut également s'accumuler dans certains tissus ou organes (exemple de l'iode et de la thyroïde). Cependant, des organes comme le cerveau présente une mauvaise distribution, en partie à cause d'une membrane protectrice, la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui entrave la diffusion de xénobiotiques dans le système nerveux central (SNC). On définit le logBB comme la grandeur logarithmique quantifiant la capacité d'un composé à traverser la BHE (absorption élevée :  $\log BB > 0.3$ , absorption moyenne :  $-1.0 < \log BB < 0.3$ , absorption faible :  $\log BB < -1.0$ ).
- **La métabolisation** : Cette étape constitue la transformation biochimique de la molécule en métabolite(s) par divers processus enzymatiques pour une excrétion efficace. Le foie est le principal organe de métabolisation et de détoxification grâce notamment aux cytochromes P450.
- **L'excrétion** : Cette phase correspondant à l'évacuation du principe actif, de son/ses métabolite(s), ou les deux entités ensembles dans des proportions

variables, hors de l'organisme. Les voies d'excrétion majoritaires sont la bile, l'urine et les fécès.

- **La toxicité :** Divers systèmes biologiques peuvent être sensibles à l'action d'une molécule xénobiotique et subir des dommages. Il est ainsi nécessaire de connaître en amont le profil toxicologique d'une substance bioactive vis-à-vis d'un organe ou un système biologique donnée. (par exemple, hépatotoxicité pour le foie, canaux hERG pour le cœur).

Lipinski *et al.* ont développé une série de règles en relation avec l'ADMET, permettant de savoir si une molécule administrée oralement peut donner lieu à un candidat médicament.<sup>346</sup> Ces règles de Lipinski sont :

- Une masse molaire  $\leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$  (valeur optimale =  $300 \text{ g.mol}^{-1}$ )
- Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène  $\leq 10$  (valeur optimale = 5)
- Nombre de donneurs de liaison hydrogène  $\leq 5$  (valeur optimale = 3)
- Un coefficient de partition octan-1-ol/eau (logP) compris entre -2 et 5 (valeur optimale = 3). Le logP (clogP) quantifie la lipophilicité d'un composé. Ce paramètre est crucial dans les phases d'absorption et de distribution et permet d'évaluer le caractère biodisponible d'un composé
- Un nombre de liaisons pivotables  $\leq 5$

Une dernière règle peut être ajoutée, c'est la surface polaire totale (*Total Polar Surface Area*, TPSA). Globalement, celle-ci doit être inférieure à  $140 \text{ \AA}^2$ .

Pour une molécule ciblant le SNC, l'évaluation de la perméabilité de la BHE est primordiale pour savoir si elle peut effectivement atteindre sa/ses cible(s) dans le cerveau. Autrement dit, les nouveaux traitements visant l'étiologie de la maladie d'Alzheimer doivent avoir une bonne pénétration dans le SNC pour être considérés comme efficaces. Ainsi, nous avons entrepris de déterminer *in silico* différents aspects ADMET de la série **B** en mettant l'accent sur les paramètres clés en relation avec le SNC (tableau III.14). Le logiciel ADME Predictor v6.5 a été utilisé pour la prédiction des paramètres ADMET.<sup>347</sup>

Pour commencer, nous constatons que les valeurs de logP calculées et les masses molaires pour la série **B** violent les règles de Lipinski pour ces deux paramètres (logP>5, MM>500). Les molécules ciblant le cerveau doivent se soumettre à des règles plus strictes.<sup>348</sup> Ainsi, les propriétés physicochimiques optimales pour un composé ciblant le SNC ont été rationalisées pour donner les paramètres suivants :

- Un logP égale à 2.8
- Une masse molaire égale à 305.3 g.mol<sup>-1</sup>
- Une TPSA égale à 44.8 Å<sup>2</sup>
- Un nombre de liaison hydrogène donneur égale à 1

Pour notre série **B**, les valeurs prédites ne remplissent pas les conditions citées précédemment.

L'estimation des différentes valeurs de pénétration de la BHE (logBB) a été effectuée avec les logiciels ADME Predictor v6.5 et QikProp v3.8<sup>349</sup> pour juger de la fiabilité de la prédiction. La moyenne globale des différences  $\Delta\log\text{BB}$  entre les deux logiciels est de 0.18 (valeur absolue). Cependant, nous pouvons noter une très grande différence de valeurs logBB pour la tacrine (ADME predictor : 0.30, QikProp : 0.04,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.26) et la 7-MEOTA (ADME predictor : 0.15, QikProp : 0.04,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.12). Ces différences de valeurs proviennent des différents algorithmes de calculs employées pour la détermination du logBB.

Globalement, les valeurs de logBB suggèrent une diffusion modérée dans le SNC pour tous les hybrides sauf pour les composés **B5** (ADME predictor : -1.23, QikProp : -1.02,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.21), **B12** (ADME predictor : -1.18, QikProp : -1.10,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.08) et **B14** (ADME predictor : -1.31, QikProp : -1.17,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.14) qui présentent une faible pénétration. Dans ce sens, des observations faites par une équipe de Pfizer suggèrent que la pénétration dans le SNC diminue avec l'augmentation de la masse molaire.<sup>350</sup> De plus, les hybrides **B12** et **B14** présentent de grandes surfaces polaires (TPSA= 113.02 Å<sup>2</sup>). Ainsi, d'après les valeurs de logBB calculées pour la pénétration cérébrale, les hybrides **B1** (ADME predictor : -0.60, QikProp : -0.51,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.09), **B2** (ADME predictor : -0.58, QikProp : -0.63,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.05),

**B3** (ADME predictor : -0.78, QikProp : -0.73,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.05) et **B6** (ADME predictor : -0.77, QikProp : -0.92,  $\Delta\log\text{BB}$ = 0.15) semble être les meilleurs candidats de la série **B** pour diffuser à travers la BHE et atteindre le cerveau, et cela, quel que soit le logiciel utilisé.

Un autre paramètre important est à prendre en compte pour un médicament administré oralement, c'est la perméabilité intestinale. Sur la base des différents modèles appliqués, toutes les structures de la série **B** ont montré de bonnes valeurs de perméabilité intestinale (*Peff*) et également de perméabilité apparente sur la lignée cellulaire MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) (*Peff* > 0.1, MDCK > 25).<sup>351</sup> Ces composés peuvent très bien être absorbés dans l'intestin grêle (% d'absorption > 96%). De plus, ils ont montré une perméabilité moyenne sur les cellules intestinales Caco-2.<sup>352</sup>

Enfin, nous avons évalué le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques. Ce paramètre affecte la biodisponibilité de la molécule pour l'enzyme ou le récepteur cible. En effet, moins le composé est lié aux protéines plasmatiques, plus il pourra traverser les membranes cellulaires ou diffuser pour atteindre son site d'action. Ainsi, les hybrides de la série **B** se lient faiblement aux protéines plasmatiques, ils sont alors disponibles pour la diffusion ou le transport au travers des membranes cellulaires. A l'instar de ce qu'a observé Atkinson *et al.*,<sup>350</sup> la liaison aux protéines plasmatiques augmente avec la masse molaire.

En ce qui concerne la toxicité, dans la phase de développement du médicament, une évaluation précoce de l'inhibition potentielle des canaux ioniques du potassium hERG (*human Ether-a-go-go Related Gene*) permet d'éviter des effets secondaires graves dans les différents essais cliniques comme des problèmes cardiaques (prolongement de l'intervalle QT). Les résultats *in silico* ont montré que tous nos composés peuvent inhiber ces canaux hERG.<sup>353</sup> De plus, les modèles suggèrent que toutes les molécules, à l'exception de **B13** et **B14** avec  $R_5 = \text{OMe}$ , sont hépatotoxiques. Enfin, les prédictions montrent que les composés de la série **B** ont un profil de pénétration cérébrale modéré à faible.<sup>354</sup> Les hybrides **B1**, **B2**, **B3**, **B6** ayant les meilleurs profils de diffusion à travers la BHE.

Tableau III.14. Prédiction *in silico* des propriétés ADMET des hybrides de la série **B**.<sup>a,b</sup>

Hybrides	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Nbre de liaisons H donneur	Nbre de liaisons H accepteur	Nbre de liaisons pivotables <sup>a</sup>	logP <sup>a</sup>	TPSA (Å <sup>2</sup> )	Nbre de violations règles de Lipinski	LogBB <sup>a,c</sup>	LogBB <sup>b,c</sup>	Pe <sub>eff</sub> (cm/s x 10 <sup>4</sup> )	Absorption intestinale humaine (%) <sup>d</sup>	Perm. <i>in vitro</i> Caco-2 (nm/sec) <sup>e</sup>	MDCK (cm/s x 10 <sup>7</sup> ) <sup>f</sup>	% Liaison aux prot. plasmatiques ( <i>in vitro</i> ) <sup>g</sup>	Toxicité <sup>a,h</sup>
<b>B1</b>	641.21	3	8	13	6.68	103.79	2	-0.60	-0.51	0.96	96.56	31.76	105.68	89.20	hE,hep
<b>B2</b>	655.24	3	8	14	7.08	103.79	2	-0.58	-0.63	1.07	96.62	33.35	91.53	89.64	hE,hep
<b>B3</b>	669.27	3	8	15	7.5	103.79	2	-0.78	-0.73	1.19	96.66	35.03	84.05	89.86	hE,hep
<b>B4</b>	683.29	3	8	16	7.91	103.79	2	-0.86	-0.94	1.32	96.71	36.69	77.24	90.38	hE,hep
<b>B5</b>	697.32	3	8	17	8.31	103.79	2	-1.23	-1.02	1.46	96.75	38.35	71.02	91.00	hE,hep
<b>B6</b>	620.79	3	8	15	6.25	103.79	2	-0.77	-0.92	0.81	96.31	36.07	119.65	89.17	hE,hep
<b>B7</b>	634.82	3	8	16	6.65	103.79	2	-0.86	-1.18	0.90	96.39	38.08	113.2	89.31	hE,hep
<b>B8</b>	648.85	3	8	17	7.06	103.79	2	-0.92	-1.24	1.0	96.47	39.59	107.2	89.76	hE,hep
<b>B9</b>	656.83	3	8	14	7.4	103.79	2	-1.01	-0.80	1.01	96.76	36.36	85.11	90.43	hE,hep
<b>B10</b>	670.85	3	8	15	7.76	103.79	2	-0.95	-0.98	1.11	96.79	38.29	79.68	91.13	hE,hep
<b>B11</b>	684.88	3	8	16	8.1	103.79	2	-0.89	-1.09	1.23	96.82	39.78	74.73	92.11	hE,hep
<b>B12</b>	713.32	3	9	17	7.7	113.02	2	-1.18	-1.10	0.99	96.95	37.78	73.57	89.79	hE,hep
<b>B13</b>	678.87	3	9	18	7.14	113.02	2	-0.74	-1.22	0.87	96.59	41.74	106.3	89.34	hE
<b>B14</b>	714.91	3	9	17	7.99	113.02	2	-1.31	-1.17	0.93	97.13	41.57	66.61	90.29	hE
<b>Tacrine</b>	198.27	2	2	0	2.54	38.92	0	0.30	0.04	0.89	96.52	25.86	264.76	95.39	tox.,hep
<b>7-Meota</b>	228.29	2	3	1	3.08	48.15	0	0.15	-0.03	0.94	96.01	27.32	203.56	92.63	hE,hep

<sup>a</sup>ADME Predictor, v6.5. <sup>b</sup>QikProp v3.8. <sup>c</sup>Valeurs basées sur la classification faite par Ma *et al.*<sup>355</sup> pour évaluer l'absorption au niveau du SNC: Absorption élevée : logBB>0.3 ; absorption moyenne : -1.0<logBB<0.3; absorption faible : logBB<-1.0. <sup>d</sup>L'absorption intestinale humaine (%AIH) représente la somme de la biodisponibilité et de l'absorption évaluée à partir du ratio de l'excrétion ou de l'excrétion cumulée dans l'urine, la bile et les fèces, faible absorption : 0%<AIH<20%, absorption moyenne : 20%<AIH<70%, bonne absorption : 70%<AIH<100%. <sup>e</sup>Les cellules Caco-2 sont dérivées d'adénocarcinomes du colon humain et possèdent plusieurs voies de transport à travers l'épithélium intestinal. faible perméabilité : <4, une perméabilité moyenne : entre 4 et 70 et une perméabilité élevée : >70. <sup>f</sup>La lignée cellulaire MDCK est considérée comme un bon modèle pour un screening rapide de la perméabilité. perméabilité faible : <25, perméabilité moyenne : entre 25 et 500, perméabilité élevée : >500. <sup>g</sup>Pourcentages de liaison aux protéines plasmatiques, liaison faible : <90%, liaison forte : >90%. <sup>h</sup>hE= inhibiteur potentiel du canal hERG ; hep= hépatotoxique potentiel.



### III.2.12 Conclusion sur la série **B**

A partir des différents résultats collectés, nous avons identifié plusieurs hybrides d'intérêt pour un développement ultérieur. Si l'on considère les résultats obtenus sur la viabilité cellulaire des cellules SH-SY5Y seules, les hybrides **B1** et **B14**, présentant une viabilité supérieure à 90% à 10  $\mu$ M, ont montré un bon profil multi-puissant sur plusieurs cibles.

Le composé **B1** est significativement moins toxique que la tacrine sur la viabilité cellulaire des cellules HepG2 à 1 mM (50.9% contre 34.4% pour la tacrine). Il a montré un fort pouvoir antioxydant (index ORAC= 6.89), une puissante et sélective inhibition de la hBuChE ( $IC_{50}$ = 0.717 nM, 64 fois plus puissant que la tacrine) et une inhibition plus modérée de la hAChE (52.3 nM, 8 fois plus puissant que la tacrine) avec une bonne inhibition de l'auto-agrégation du peptide  $A\beta_{1-42}$  (73.5 % à 50  $\mu$ M). L'hybride **B1** a présenté un profil de neuroprotection modéré contre le stress oxydant induit par  $A\beta_{1-42}$  (52.3%) et l'oligomycine A/roténone (O/R : 30.5%) mais une bonne neuroprotection contre le peroxyde d'hydrogène (76.6%) sur les cellules SH-SY5Y à 1  $\mu$ M. De plus, selon les prédictions ADMET, l'hybride **B1** présente le meilleur profil de pénétration du SNC parmi les autres composés de la série **B** (Schéma III.24).

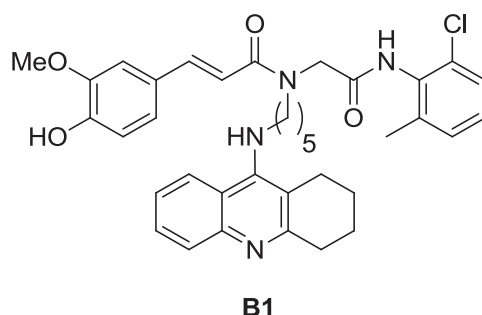
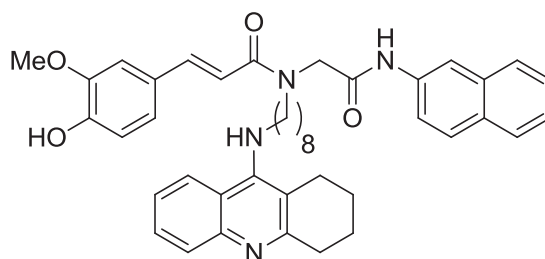


Schéma III.24. Structure de l'hybride **B1** et ses principales caractéristiques pharmacologiques.

L'hybride **B14** présente, certes, un profil ADMET moins attractif (diffusion à travers la BHE faible) et une inhibition modérée mais sélective de la hBuChE (68.2 nM). Néanmoins, les profils antioxydant et d'inhibition de l'auto-agrégation du peptide  $A\beta_{1-42}$  sont bons (index ORAC= 4.29 et  $A\beta_{1-42}$  = 65.6% à 50  $\mu$ M). Ce composé dépasse de loin les autres hybrides de la série **B** dans l'évaluation de l'hépatotoxicité (59.4%, 1.7 fois moins toxique que la tacrine à 1

mM). En termes de neuroprotection, l'hybride **B14** possède une neuroprotection bonne à modérée contre les inducteurs testés de stress oxydant ( $A\beta_{1-40}$ : 74.7%,  $A\beta_{1-42}$ : 46.3%,  $H_2O_2$  : 52.7%, O/R : 40.0%) sur les cellules SH-SH5Y à 1  $\mu$ M (Schéma III.25).



**B14**

Schéma III.25. Structure de l'hybride **B14**.

Enfin, nous soulignons la sélectivité de ces hybrides pour la BuChE. En effet, la concentration en AChE diminue chez les patients atteints de formes modérés à sévères de la maladie d'Alzheimer alors que l'activité de la BuChE augmente significativement.<sup>356</sup> Cela suggère que l'hydrolyse de l'ACh pourrait principalement se faire *via* l'action enzymatique de la BuChE.<sup>357</sup> Ainsi, l'inhibition spécifique de cette enzyme peut être importante pour accroître la concentration synaptique en ACh et améliorer la cognition chez les malades d'Alzheimer.<sup>358</sup>

### III.3 Etude des hétérotrimères tacrine-mélatonine-acide antioxydant (série C)

#### III.3.1 Introduction

Dans la continuité de la stratégie « multicomposants » que nous avons amorcé pour la synthèse et l'évaluation biologique de la série **B** et en nous inspirant d'hybrides tacrine-mélatonine déjà décrit auparavant, nous avons voulu combiner dans un même adduit de Ugi, deux motifs antioxydants : un motif mélatonine et un motif acide férulique ou lipoïque.

La présence de deux fragments antioxydant pourrait renforcer le potentiel antioxydant des hybrides tout en gardant une forte inhibition des cholinestérases grâce à la présence d'un linker tacrine ou 7-MEOTA.

Ainsi, nous avons synthétisé et évalué pharmacologiquement de nouveaux hétérotrimères tacrine-mélatonine-acide férulique et tacrine-mélatonine-acide lipoïque (série **C**, Schéma III.26).

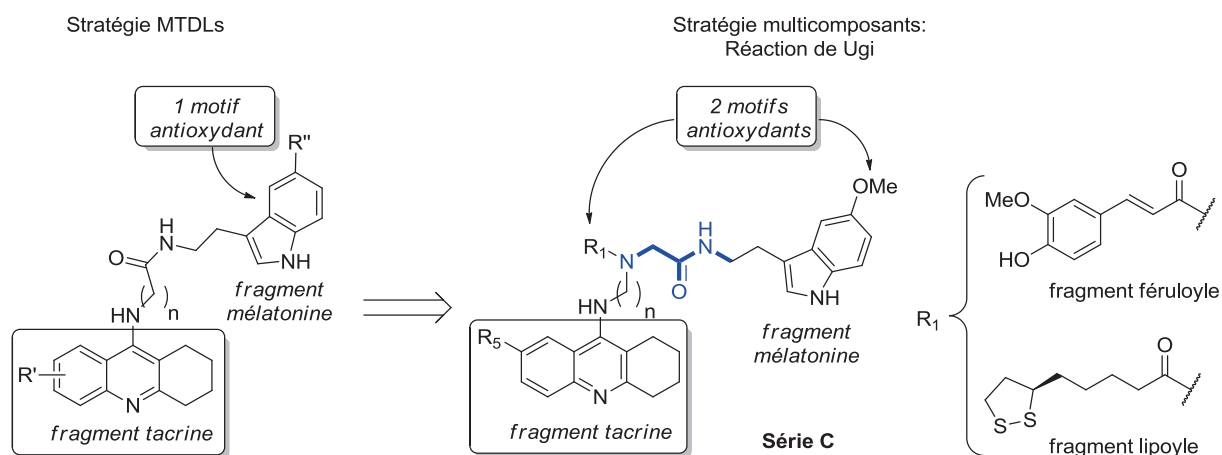


Schéma III.26. Stratégie adoptée pour les hétérotrimères tacrine-mélatonine-acide antioxydant (série **C**).

III.3.2 Synthèse de la série **C**

Comme pour la synthèse de la série **B**, le protocole de synthèse décrit par Pérez-Labrada *et al.* a été mis en œuvre.<sup>317</sup> Ainsi, la réaction à température ambiante de l'acide férulique ou de l'acide lipoyique, du paraformaldéhyde, des linkers tacrine **3d** et 7-MEOTA **3f-h** et du 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** dans un mélange méthanol/dichlorométhane 3:1 (v/v) pendant 24h, fournit les hybrides **C1-C8** avec des rendements variant de 31% à 61% (Schéma III.27, tableau III.14).

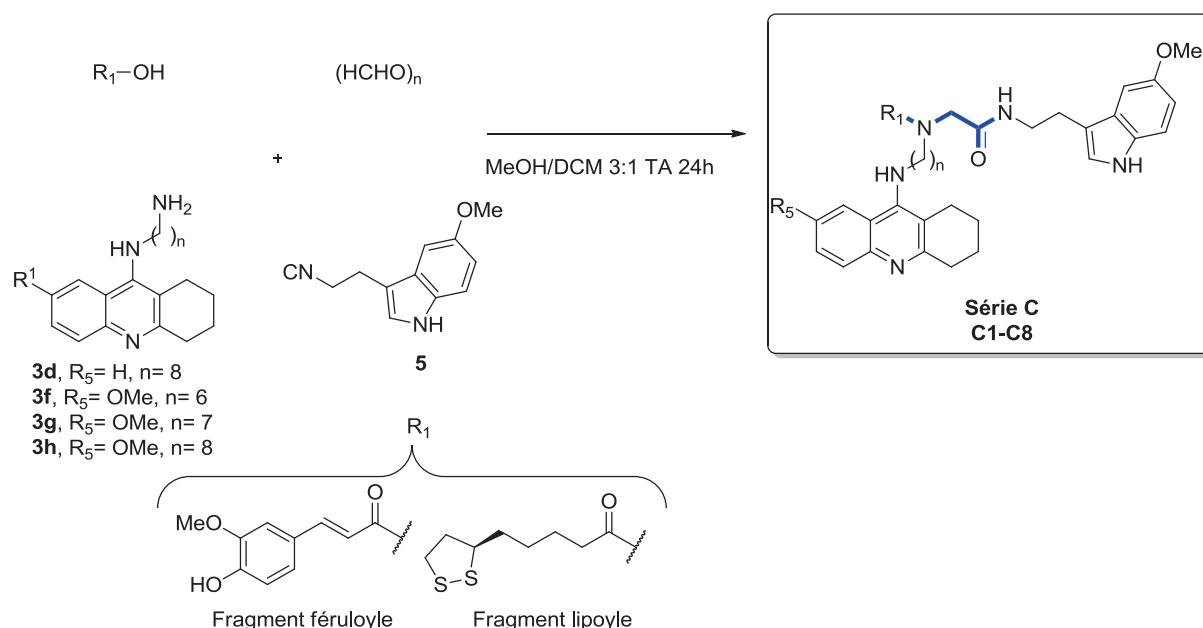


Schéma III.27. Synthèse des hétérotrimères tacrine-mélatonine-acide antioxydant (série **C**) par la réaction de Ugi.

Tableau III.14. Répertoire des rendements de la série **C**.

Hybride	n	R <sub>1</sub>	R <sub>5</sub>	Rendement
<b>C1</b>	8	féruyle	H	45%
<b>C2</b>	6	féruyle	OMe	31%
<b>C3</b>	7	féruyle	OMe	31%
<b>C4</b>	8	féruyle	OMe	40%
<b>C5</b>	8	lipoyle	H	41%
<b>C6</b>	6	lipoyle	OMe	61%
<b>C7</b>	7	lipoyle	OMe	49%
<b>C8</b>	8	lipoyle	OMe	41%

### III.3.3 Evaluation de l'hépatotoxicité

L'évaluation de la viabilité cellulaire des cellules HepG2 de la série **C** a été menée de la même façon que pour la série **B**, c'est-à-dire en utilisant le test MTT décrit auparavant (cf. Chap. III, III.2.4.2).

Le tableau III.15 regroupe les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus pour des concentrations en composé comprises entre 1  $\mu\text{M}$  et 1000  $\mu\text{M}$ . La tacrine et la mélatonine ont été choisies comme références. Nous remarquons d'ailleurs que la mélatonine est beaucoup moins toxique que la tacrine pour de fortes concentrations (100, 300 et 1000  $\mu\text{M}$ ).

De manière générale, tous les hybrides de la série **C** présentent des valeurs de viabilité cellulaire supérieures à ceux de la tacrine à 1000  $\mu\text{M}$ . Cependant, ces valeurs restent plus faibles en comparaison avec la mélatonine (72.3% à 1000  $\mu\text{M}$ ).

Parmi les hybrides **C1-C4** portant un motif féruloyle, les meilleurs résultats de viabilité sont obtenus pour les composés avec la  $R_5 = \text{OMe}$ , l'hybride **C3** ( $n = 7$ ) étant le moins toxique de la série (68.7% à 1000  $\mu\text{M}$ , 2 fois moins toxique que la tacrine). Parmi les hybrides **C5-C8** portant un motif lipoyloyle, nous notons que le composé **C8** ( $n = 8$ ) présente les meilleures valeurs de viabilité de la série jusqu'à 300  $\mu\text{M}$  avant que celle-ci chute brutalement à 1000  $\mu\text{M}$  (**C8** : de 77.8% à 300  $\mu\text{M}$  à 44.9% à 1000  $\mu\text{M}$ ).

Si l'on se place maintenant à 1000  $\mu\text{M}$ , nous remarquons que les composés **C5** ( $n = 8$ ) et **C7** ( $n = 7$ ) présentent quasiment la même toxicité (**C5** : 48.8%, **C7** : 48.9%). Globalement pour la série **C5-C8**, les pourcentages de viabilité HepG2 sont proches. Concernant le rôle du linker, aucune tendance ne semble se dessiner pour l'ensemble de la série **C**.

En conclusion, les hybrides **C1-C4** portant un fragment féruloyle sont moins toxiques sur les cellules HepG2 que les hybrides **C5-C8** portant un fragment lipoyloyle.

Tableau III.15. Viabilité *in vitro* des cellules HepG2 en présence des composés de la série **C**, de la mélatonine et de la tacrine.<sup>a</sup>

Hybride	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	300 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
<b>C1</b>	98.8 $\pm$ 1.9 <sup>ns</sup>	94.8 $\pm$ 3.3 <sup>ns</sup>	85.4 $\pm$ 4.4*	84.5 $\pm$ 3.6**	53.3 $\pm$ 0.9***	51.3 $\pm$ 1.3***	49.7 $\pm$ 0.4***
<b>C2</b>	98.5 $\pm$ 1.0 <sup>ns</sup>	97.2 $\pm$ 0.2 <sup>ns</sup>	96.0 $\pm$ 1.3 <sup>ns</sup>	91.9 $\pm$ 2.2 <sup>ns</sup>	70.3 $\pm$ 3.0***	67.6 $\pm$ 2.3***	56.5 $\pm$ 2.2***
<b>C3</b>	100.2 $\pm$ 0.7 <sup>ns</sup>	100.2 $\pm$ 0.4 <sup>ns</sup>	99.1 $\pm$ 0.3 <sup>ns</sup>	98.2 $\pm$ 0.4 <sup>ns</sup>	84.7 $\pm$ 2.8***	69.9 $\pm$ 2.2***	68.7 $\pm$ 3.3***
<b>C4</b>	100.5 $\pm$ 1.0 <sup>ns</sup>	96.5 $\pm$ 2.8 <sup>ns</sup>	92.6 $\pm$ 2.6 <sup>ns</sup>	84.2 $\pm$ 3.4***	61.0 $\pm$ 1.9***	56.0 $\pm$ 0.5***	54.4 $\pm$ 0.9***
<b>C5</b>	98.6 $\pm$ 0.4 <sup>ns</sup>	97.8 $\pm$ 1.3 <sup>ns</sup>	95.9 $\pm$ 1.0 <sup>ns</sup>	89.8 $\pm$ 0.9**	86.2 $\pm$ 2.8***	58.9 $\pm$ 1.3***	48.8 $\pm$ 0.8***
<b>C6</b>	95.5 $\pm$ 0.8 <sup>ns</sup>	89.5 $\pm$ 3.2*	84.0 $\pm$ 0.9***	81.6 $\pm$ 1.5***	68.7 $\pm$ 2.8***	46.4 $\pm$ 1.5***	44.8 $\pm$ 1.8***
<b>C7</b>	99.6 $\pm$ 1.9 <sup>ns</sup>	98.7 $\pm$ 0.6 <sup>ns</sup>	97.9 $\pm$ 1.1 <sup>ns</sup>	80.7 $\pm$ 2.6***	62.8 $\pm$ 2.0***	57.7 $\pm$ 1.6***	48.9 $\pm$ 4.4***
<b>C8</b>	98.1 $\pm$ 0.9 <sup>ns</sup>	94.1 $\pm$ 1.1 <sup>ns</sup>	92.5 $\pm$ 0.9 <sup>ns</sup>	86.9 $\pm$ 1.0**	86.2 $\pm$ 2.5**	77.8 $\pm$ 3.2***	44.9 $\pm$ 2.3***
<b>Mélato.</b>	98.9 $\pm$ 0.1 <sup>ns</sup>	98.2 $\pm$ 0.4 <sup>ns</sup>	94.3 $\pm$ 1.4 <sup>ns</sup>	94.3 $\pm$ 3.7 <sup>ns</sup>	91.4 $\pm$ 1.5 <sup>ns</sup>	71.8 $\pm$ 1.7***	72.3 $\pm$ 2.3***
<b>Tacrine</b>	93.4 $\pm$ 4.7 <sup>ns</sup>	90 $\pm$ 3.0 <sup>ns</sup>	88.7 $\pm$ 3.4 <sup>ns</sup>	81.6 $\pm$ 4.9*	64.3 $\pm$ 4.5***	40 $\pm$ 2.2***	34.4 $\pm$ 2.7***

<sup>a</sup>Tous les hybrides ont été incubés pendant 24h. La viabilité cellulaire est normalisée en % par rapport au groupe contrôle. Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  SEM d'au moins trois différentes cultures. Tous les composés ont été testés en concentrations croissante (1-1000  $\mu$ M). \*\*\*P $\leq$  0.001, \*\*P $\leq$  0.01, \*P $\leq$ 0.05 et ns: non significative, en comparaison avec le groupe contrôle. La comparaison entre les hybrides testés et le groupe contrôle a été réalisée grâce au test statistique one-way ANOVA suivie du test de Newman-Keuls.

### III.3.4 Evaluation de l'inhibition des cholinestérases

Une fois que nous avons réalisé l'évaluation de la viabilité cellulaire des cellules HepG2 en présence des hybrides de la série **C**, nous avons testé cette même série sur l'*EeAChE* et la *eqBuChE* en suivant le protocole d'Ellman (cf. Chap III, II.2.1).<sup>311</sup>

Les résultats sont rassemblés dans le tableau III.16. En premier lieu, nous pouvons voir que les hybrides de la série **C** sont des inhibiteurs puissants et sélectifs de la *eqBuChE* avec des valeurs d'inhibitions allant de 1.25 nM à 12.0 nM. L'hybride **C5**, portant un fragment lipoyle, s'est révélé être le meilleur inhibiteur de l'*EeAChE* (IC<sub>50</sub>= 3.6 nM, 4 fois plus actif que la tacrine) mais aussi de la *eqBuChE* (IC<sub>50</sub>= 1.25 nM, 12 fois plus actif que la tacrine). Il est également 18.9% moins toxique à 300  $\mu$ M que la tacrine.

Il est intéressant de noter que grâce à cette étude, nous obtenons une nette amélioration du profil d'inhibition des cholinestérases par les composés de la série **C** comportant une 7-MEOTA (**C2**, **C3**, **C4**, **C6**, **C7**, **C8**) en comparaison avec les hybrides **B12-B14** de la série **B**. En ce qui concerne l'inhibition de la *eqBuChE* par la série **C1-C4** portant un motif féruloyle, dans les dérivés substitués par un fragment 7-MEOTA **C2-C4**, l'inhibition reste aux alentours de 3

nM pour **C2** (n= 6, IC<sub>50</sub>= 3.0 nM) et **C3** (n= 7, IC<sub>50</sub>= 2.9 nM). Cependant, celle-ci diminue pour l'hybride **C4** (n= 8, IC<sub>50</sub>= 12.0 nM) étant ainsi 4 fois moins puissant que les hybrides **C2/C3**. Pour la même taille de linker (n= 8), l'hybride **C1** est 5 fois plus actif sur l'inhibition de la eqBuChE, mais sans surprise, 4.7 % plus hépatotoxique que le composé **C4** avec un motif 7-MEOTA.

Parmi les composés **C2-C4**, l'inhibiteur le plus puissant de la *EeAChE* est le composé **C3** (n= 7, IC<sub>50</sub>= 8.37 nM) étant respectivement 2 et 3.5 fois plus actif que les composés **C2** (n= 6, IC<sub>50</sub>= 17.8 nM) et **C4** (n= 8, IC<sub>50</sub>= 29.7 nM). Comme pour l'inhibition de la eqBuChE, pour la même taille de linker, l'hybride **C1** inhibe 2 fois plus l'*EeAChE* que l'hybride **C4**. Dans la série féruloyle, l'inhibiteur le plus puissant de la eqBuChE est l'hybride **C1** (n=8, IC<sub>50</sub>= 2.3 nM) alors que l'hybride **C3** est l'inhibiteur le plus actif sur l'*EeAChE* (n= 7, IC<sub>50</sub>= 8.37 nM).

Tableau III.16. Inhibitions (IC<sub>50</sub>, nM) de l'*EeAChE* et la eqBuChE par la série **C** et la tacrine.

Hybride	n	R <sub>1</sub>	R <sub>5</sub>	<i>EeAChE</i> <sup>a</sup>	eqBuChE <sup>a</sup>	Sélectivité <sup>b</sup>
<b>C1</b>	8	féruloyle	H	13.9±1.4	2.3±0.2	6.2
<b>C2</b>	6	féruloyle	OMe	17.8±2.3	3.0±0.3	6.0
<b>C3</b>	7	féruloyle	OMe	8.37±0.08	2.9±0.4	2.9
<b>C4</b>	8	féruloyle	OMe	29.7±5.9	12.0±2.2	2.5
<b>C5</b>	8	lipoyle	H	3.6±0.3	1.25±0.00	2.9
<b>C6</b>	6	lipoyle	OMe	16.0±1.1	3.9±0.1	4.1
<b>C7</b>	7	lipoyle	OMe	7.6±0.3	5.4±0.6	1.4
<b>C8</b>	8	lipoyle	OMe	14.8±0.6	8.2±1.1	1.8
<b>Tacrine</b>	-	-	-	44.3±1.5	5.1±0.2	8.7

<sup>a</sup>Les courbes d'inhibitions ont été obtenues par régression non linéaire. Chaque IC<sub>50</sub> est la moyenne ± SEM de quadruplicat d'au moins 3 différentes expériences. <sup>b</sup>Ratio IC<sub>50</sub>(*EeAChE*)/IC<sub>50</sub>(eqBuChE).

Concernant l'inhibition de la eqBuChE due aux dérivés lipoyle avec R<sub>5</sub>= OMe **C6-C8**, l'activité inhibitrice diminue de 1.4 fois de **C6** à **C7** et de 1.5 fois de **C7** à **C8** (n= 8). Ce dernier composé **C8** (n= 8, IC<sub>50</sub>= 8.2 nM) étant l'inhibiteur le moins actif de la série **C5-C8**. Pour la même taille de linker (n= 8), l'hybride **C5** (R<sub>5</sub>= H) est 6.5 fois plus actif dans l'inhibition de la eqBuChE mais aussi 18.9 % plus toxique sur les cellules HepG2 à 300 µM que le composé **C8** (R<sub>5</sub>= OMe). Pour l'inhibition de l'*EeAChE* et parmi les hybrides **C6-C8** avec R<sub>5</sub>= OMe, le meilleur inhibiteur est l'hybride **C7** qui est 2 fois plus actif que les composés **C6** (n= 6, IC<sub>50</sub>= 16.0 nM) et **C8** (n= 8, IC<sub>50</sub>= 14.8 nM). Comme pour l'inhibition de la eqBuChE, pour la même taille de linker (n= 8), l'hybride **C5** est 4 fois plus actif sur l'*EeAChE* que le composé **C8**.

En comparant les hybrides avec un motif féruloyle **C1-C4** et ceux possédant un motif lipoyle **C5-C8**, pour la même longueur de linker et le même substituant R<sub>5</sub>, nous pouvons conclure que les hybrides **C1** et **C4** sont moins bons inhibiteurs des cholinestérases que les hybrides **C6** et **C7**, respectivement.

### III.3.5 Evaluation de la capacité antioxydante

Cette évaluation a été faite grâce au test ORAC-FL décrit auparavant (cf. Chap. III, III.2.9.1).<sup>331,332</sup> Nous avons pris comme références la mélatonine (index ORAC= 2.45), l'acide férulique (index ORAC= 3.74) et l'acide lipoïque (index ORAC= 0.24). Les résultats sont exprimés en équivalent trolox (index ORAC= 1).

Comme nous pouvons le voir dans le tableau III.17, les hybrides **C1-C4** portant un fragment féruloyle ont une forte capacité antioxydante, avec des valeurs allant de 9.11 pour le composé **C3** à 7.27 pour le composé **C4**. Ainsi, le composé **C3** est respectivement 3.7, 2.4 et 38 fois plus actif que la mélatonine, l'acide férulique et l'acide lipoïque.

Dans la série **C1-C4** avec un motif féruloyle, pour les composés avec R<sub>5</sub>= OMe, les index ORAC augmentent du composé **C2** (n= 6, index ORAC= 8.51) au composé **C3** (n= 7, index ORAC= 9.11) mais diminuent du composé **C3** (n= 7) au composé **C4** (n= 8, index ORAC= 7.27). Il est intéressant de noter que cette tendance est la même que celle observée dans la viabilité cellulaire des cellules HepG2 à 100, 300 et 1000 µM, le composé **C3** étant le moins toxique sur les cellules HepG2. Enfin, pour la même taille de linker (n= 8), nous notons que le composé **C1** (R<sub>5</sub>= H) est légèrement plus puissant que l'hybride **C4** (R<sub>5</sub>= OMe).

Dans la série **C5-C8** avec un motif lipoyle, nous pouvons voir que les index ORAC augmentent avec la taille du linker et que pour une taille de linker n= 8, l'hybride **C8** (R<sub>5</sub>= OMe, index ORAC= 3.68), étant le plus puissant antioxydant de la série **C5-C8**, est 2.5 fois plus puissant que le composé **C5** (R<sub>5</sub>= H, index ORAC= 1.46).



Enfin, nous observons que, quel que soit la longueur du linker et le type de substituant R<sub>5</sub>, pour le même analogue, les hybride **C1-C4** avec un motif féruloyle ont un meilleur pouvoir antioxydant que les hybrides **C5-C8** portant un fragment lipoyle.

Tableau III.17. Index ORAC des hybrides de la série **C**.<sup>a</sup>

Hybride	Index ORAC	Hybride	Index ORAC
<b>C1</b>	7.98±0.19	<b>C7</b>	1.8±0.08
<b>C2</b>	8.51±0.19	<b>C8</b>	3.68±0.15
<b>C3</b>	9.11±0.21	<b>Mélatonine</b>	2.45±0.09
<b>C4</b>	7.27±0.17	<b>Acide férulique</b>	3.74±0.22
<b>C5</b>	1.46±0.34	<b>Acide lipoïque</b>	0.24±0.06
<b>C6</b>	1.79±0.15	<b>Trolox</b>	1

<sup>a</sup>Données exprimées en équivalents trolox. Moyennes ± SD de trois essais consécutifs.

### III.3.6 Conclusion sur la série **C**

Globalement, les résultats de capacité antioxydante valident et confirment notre approche multicomposants portant sur l'incorporation d'un deuxième fragment antioxydant dans nos hybrides et suggèrent que les résultats obtenus ne sont pas seulement la simple somme des différents index ORAC des molécules de références (mélatonine, acides férulique/lipoïque) utilisés dans notre concept.

Bien au contraire, nous obtenons une véritable synergie entre les fragments antioxydants mélatonine/acide férulique pour les composés **C1-C4**. En tenant compte ensuite des différents résultats de viabilité cellulaire sur les cellules HepG2 et d'inhibitions des cholinestérases et de capacité antioxydante, nous avons identifié l'hétérotrimère **C3** comme ayant le meilleur profil pharmacologique de la série **C**.

L'hybride **C3** (Schéma III.28) est en effet le moins toxique de la série **C** sur les cellules HepG2 (68.7% à 1000 µM). De plus, il possède de bonnes propriétés anticholinestérasiques (*FeAChE* : IC<sub>50</sub>= 8.37 nM ; *eqBuChE* : IC<sub>50</sub>= 2.9 nM) et une excellente capacité antioxydante (index ORAC= 9.11).

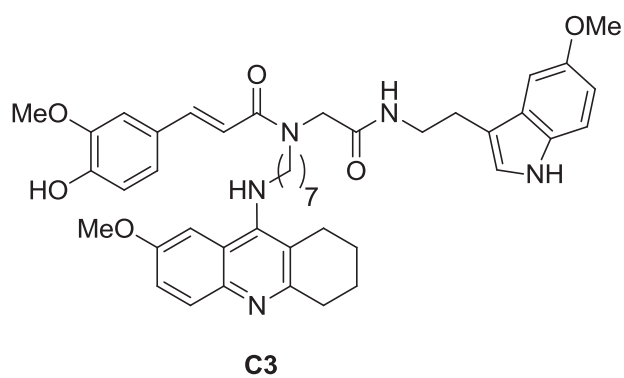


Schéma III.28. Structure de l'hybride **C3**.

### III.4 Etude des hybrides donépézil-acide férulique (série **D**)

#### III.4.1 Introduction

La stratégie adoptée ici a été de combiner la structure *N*-benzylpipéridine rencontrée dans le donépézil avec l'acide férulique pour former de nouveaux adduits de Ugi (série **D**). Le choix d'introduire le fragment *N*-benzylpipéridine permet notamment de s'affranchir de l'hépatotoxicité induite par un fragment tacrine, tel que nous avons pu le voir pour certains hybrides des séries **B** et **C**. Les fragments  $R_2$  rattachés à la sous-structure glycine sont les mêmes utilisés dans la préparation des séries précédentes et permettront de moduler de l'activité anticholinestérasique et la capacité antioxydante (Schéma III.29).

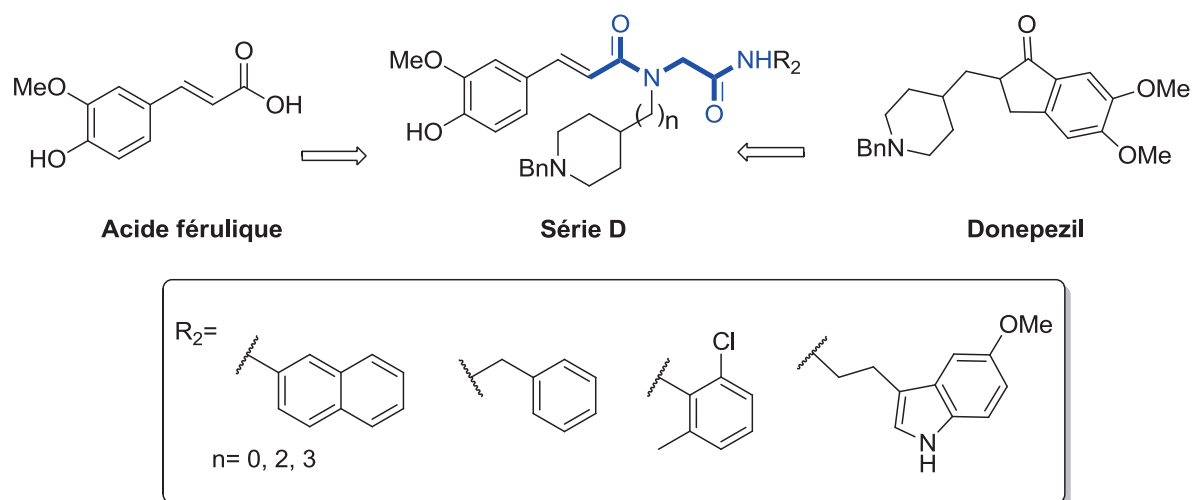
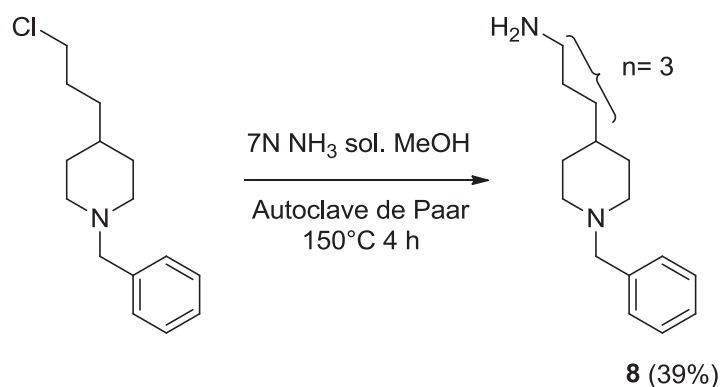


Schéma III.29. Stratégie adoptée pour la synthèse des hybrides donépézil-acide férulique (série **D**).

#### III.4.2 Synthèse de la série **D**

Préalablement à la synthèse de la série **D**, nous avons synthétisé le composé 3-(1-benzylpipéridin-4-yl)propan-1-amine ( $n = 3$ ) avec un rendement de 39% par la réaction, à 150°C (autoclave de Paar), de la 1-benzyl-4-(3-chloropropyl)piperidine avec de l'ammoniac en solution 7N dans le méthanol (Schéma III.30).

Schéma III.30. Synthèse de la 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine **8**.

Le protocole de synthèse décrit précédemment pour les séries **B** et **C** a été utilisé.<sup>317</sup> La réaction à température ambiante de l'acide férulique, du paraformaldéhyde, de différents motifs *N*-benzylpiperidine [1-benzylpiperidin-4-amine ( $n=0$ ) et la 2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethanamine ( $n=2$ ), 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine **8** ( $n=3$ )] et de différents isonitriles (2-isocyanonaphtalène, isocyanure de benzyle, 1-chloro-2-isocyano-3-méthylbenzène ou 3-(2-isocyanoéthyl)-5-méthoxy-1*H*-indole **5** dans un mélange méthanol/dichlorométhane 3:1 (v/v) et pendant 24h, fournit les hybrides **D1-D12** avec des rendements variant de 17% à 61% (Schéma III.31, tableau III.18).

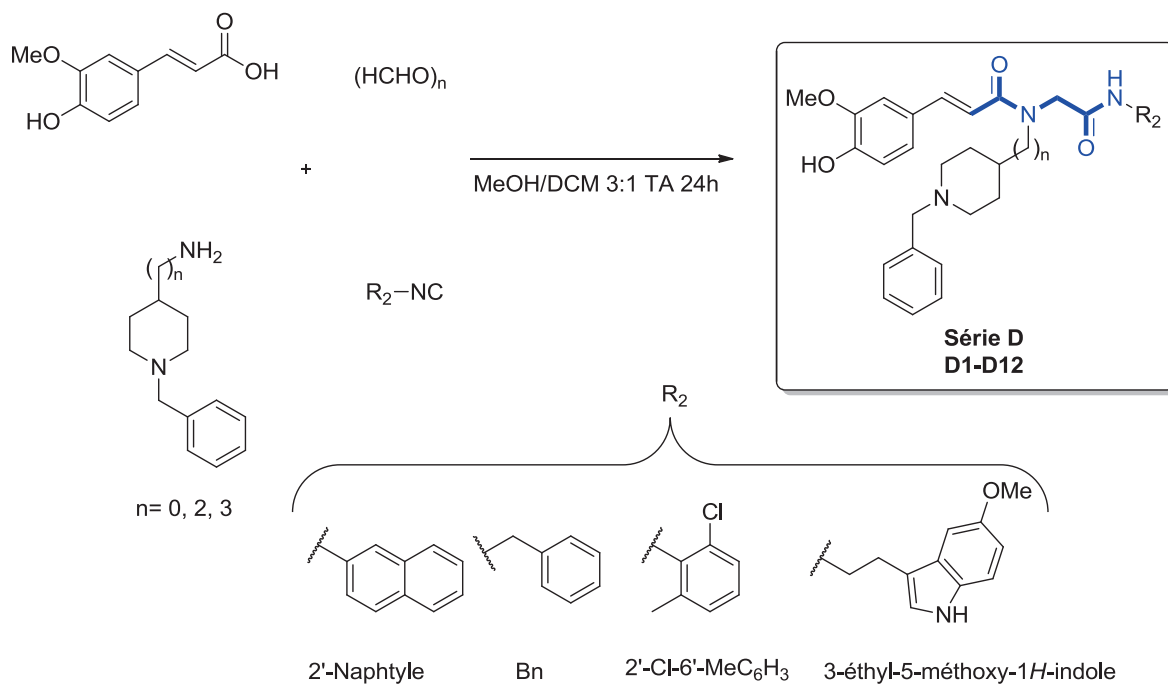
Schéma III.31. Synthèse des hybrides donépézil-acide férulique (série **D**) par la réaction de Ugi.

Tableau III.18. Répertoire des rendements de la série **D**.

Hybride	n	R <sub>2</sub>	Rendement
<b>D1</b>	0	2'-Naphtyle	28%
<b>D2</b>	0	Bn	61%
<b>D3</b>	0	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	45%
<b>D4</b>	0	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	28%
<b>D5</b>	2	2'-Naphtyle	17%
<b>D6</b>	2	Bn	56%
<b>D7</b>	2	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	27%
<b>D8</b>	2	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	29%
<b>D9</b>	3	2'-Naphtyle	34%
<b>D10</b>	3	Bn	40%
<b>D11</b>	3	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	23%
<b>D12</b>	3	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	25%

### III.4.3 Evaluation de l'inhibition sur les cholinestérases

Cette évaluation a été conduite sur l'*EeAChE* et la *eqBuChE* en utilisant le protocole d'Ellman (cf. Chap. III, II.2.1).<sup>311</sup> Comme nous pouvons voir dans le tableau III.19, seuls les hybrides **D9-D12**, avec un linker propylène, ont montré une inhibition acceptable de l'*EeAChE*. Bien qu'il soit 1.4 fois moins actif que le donépézil, l'hybride **D11** (IC<sub>50</sub>= 29.3 nM) est le plus actif sur *EeAChE*.

Concernant l'inhibition de la *eqBuChE*, seul le composé **D8** (linker éthylène) et les hybrides **D9-D12** sont des inhibiteurs nanomolaires. L'hybride **D8** (IC<sub>50</sub>= 10.39 nM) est le plus puissant inhibiteur de la *eqBuChE*, étant 198 fois plus actif que le donépézil. Il est également totalement sélectif de l'inhibition de la *eqBuChE*, alors que l'hybride **D11** et **D12**, étant de bons inhibiteurs de la *eqBuChE*, ont aussi montré des inhibitions correctes de la *EeAChE* (**D11** : IC<sub>50</sub>= 29.3 nM, **D12** : IC<sub>50</sub>= 75.0 nM) avec respectivement des sélectivités de 0.56 et 3.73.

Tableau III.19. Inhibitions (IC<sub>50</sub>, nM) de *EeAChE* et *eqBuChE* par la série **D** et du donépézil.

Hybride	n	R <sub>2</sub>	<i>EeAChE</i> <sup>a</sup>	<i>eqBuChE</i> <sup>a</sup>	Sélectivité <sup>b</sup>
<b>D1</b>	0	2'-Naphthyle	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	-
<b>D2</b>	0	Bn	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	-
<b>D3</b>	0	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	-
<b>D4</b>	0	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	-
<b>D5</b>	2	2'-Naphthyle	36.9±1.4 <sup>d</sup>	74.6±2.9 <sup>d</sup>	-
<b>D6</b>	2	Bn	33.6±1.3 <sup>d</sup>	57.1±0.6 <sup>d</sup>	-
<b>D7</b>	2	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	24.8±4.1 <sup>d</sup>	57.3±5.8 <sup>d</sup>	-
<b>D8</b>	2	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	- <sup>c</sup>	10.4±0.5	-
<b>D9</b>	3	2'-Naphthyle	37.2±1.2	182.0±11.2	0.2
<b>D10</b>	3	Bn	51.1±3.0	105.3±8.2	0.5
<b>D11</b>	3	2'-Cl-6'-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	29.3±2.2	52.3±2.0	0.6
<b>D12</b>	3	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	75.0±3.4	20.1±1.9	3.7
<b>Donépézil</b>	-	-	20.8±2.1	2057±290	8.7

<sup>a</sup>Les courbes d'inhibitions ont été obtenues par régression non linéaire. Chaque IC<sub>50</sub> ou % d'inhibition est la moyenne ± SEM de quadruplicat d'au moins 3 différentes expériences. <sup>b</sup>Ratio IC<sub>50</sub>(*EeAChE*)/IC<sub>50</sub>(*eqBuChE*).

<sup>c</sup>Pas actif. <sup>d</sup>Pourcentage d'inhibition à 1 µM.

En résumé, nous pouvons conclure que pour cette série, plus le linker est long, meilleure est l'inhibition des cholinestérases. Concernant l'inhibition de la *eqBuChE*, les hybrides **D8** (n= 2) et l'hybride **D12** (n= 3), tous les deux substitués par un fragment mélatonine, sont les meilleurs inhibiteurs de la série **D**. Cependant, pour l'*EeAChE*, le composé **D11** (n= 3), portant un motif 2'-chloro-6'-méthylphényle, est le meilleur inhibiteur. Cela suggère que des linkers plus long pourraient probablement aussi améliorer la sélectivité en faveur de l'*EeAChE*.

#### III.4.4 Evaluation de la capacité antioxydante

Pour cette évaluation, le test ORAC-FL a été utilisé (cf. chap. III, III.2.9.1).<sup>331,332</sup> La mélatonine (index ORAC= 2.45) et l'acide férulique (index ORAC= 3.74) ont été pris comme références. Comme nous pouvons le voir dans le tableau III.20, ces hybrides ont montré des index ORAC variant entre 4.80 et 8.71, bien supérieurs aux index ORAC trouvés pour la mélatonine et l'acide férulique, confirmant ainsi leur pouvoir antioxydant.

Les hybrides **D8** (index ORAC= 8.71), **D4** (index ORAC= 8.56) et **D12** (index ORAC= 8.48), portant un fragment mélatonine, dans cet ordre du plus puissant au plus faible, sont les plus puissants antioxydants de la série **D**. Cela est dû à la présence simultanée des fragments acides férulique et mélatonine dans structure de ces hybrides.

Tableau III.20. Index ORAC des hybrides de la série **D**.<sup>a</sup>

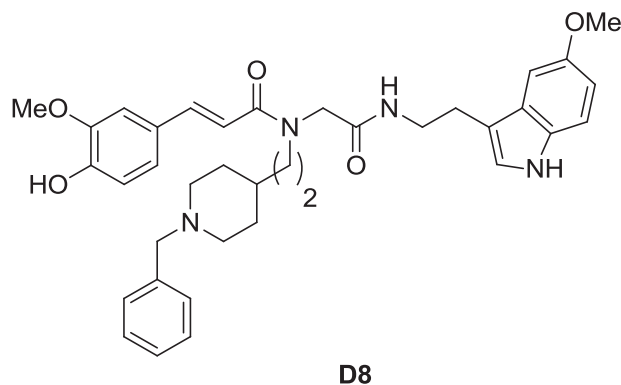
Hybride	Index ORAC	Hybride	Index ORAC
<b>D1</b>	6.00±0.32	<b>D9</b>	5.63±0.33
<b>D2</b>	6.07±0.43	<b>D10</b>	4.80±0.27
<b>D3</b>	5.98±0.21	<b>D11</b>	5.32±0.14
<b>D4</b>	8.56±0.52	<b>D12</b>	8.48±0.33
<b>D5</b>	8.01±0.06	<b>Mélatonine</b>	2.45±0.09
<b>D6</b>	6.14±0.63	<b>Acide férulique</b>	3.74±0.22
<b>D7</b>	6.90±0.39	<b>Trolox</b>	1
<b>D8</b>	8.71± 0.20		

<sup>a</sup>Données exprimées en équivalents trolox. Moyennes ± SD de trois essais consécutifs.

#### III.4.5 Conclusion sur la série **D**

Premièrement, nous concluons que les hybrides **D9-D12** (n= 3) sont des inhibiteurs nanomolaires de l'*EeAChE*, légèrement moins actifs que le donépézil. Les composés **D9-D12** sont aussi des inhibiteurs nanomolaires de la *eqBuChE*, bien plus actifs que le donépézil. De plus, ces molécules sont de meilleurs antioxydants que la mélatonine et l'acide férulique pris comme références. Nous obtenons ainsi des hybrides multi-cibles d'intérêt.

De cette étude préliminaire, nous avons identifié le composé **D8** comme ayant le meilleur profil multi-cibles avec une grande capacité antioxydante (index ORAC= 8.71) qui se comportent comme un inhibiteur nanomolaire totalement sélectif vers la *eqBuChE* (IC<sub>50</sub>= 10.4 nM). Cela est assez intéressant car l'hybride **D8** pourrait en plus de la capture de radicaux libre, empêcher d'éventuels dommages neuronaux causés par le stress oxydant et avoir ainsi un potentiel effet neuroprotecteur. Des essais pharmacologiques complémentaires sont prévus dans ce sens (Schéma III.32).

Schéma III.32 Structure du composé **D8**.

### III.5 Etude des dérivés chromone (série E)

#### III.5.1 Introduction

Les chromones se retrouvent quasiment partout dans le règne végétale. Ce sont des hétérocycles oxygénés 4*H*-chromèn-4-one (ou 4*H*-1-benzopyran-4-one) comportant une sous-structure  $\gamma$ -pyrone accolée à un motif benzène. Les produits naturels basés sur un motif chromone présentent diverses activités biologiques.<sup>359</sup> Parmi ces composés, nous pouvons citer la famille des flavonoïdes (présents naturellement sous forme d'hétérosides) qui possèdent notamment des propriétés antioxydantes (Schéma III.33).

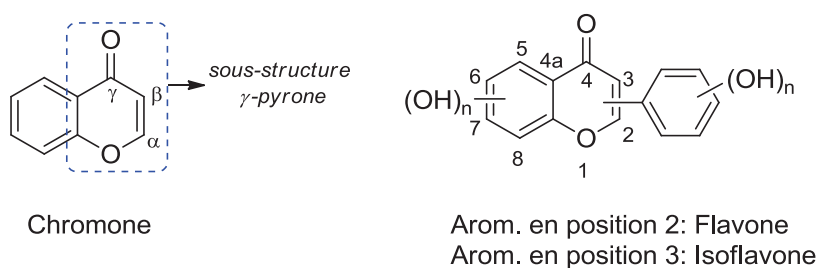
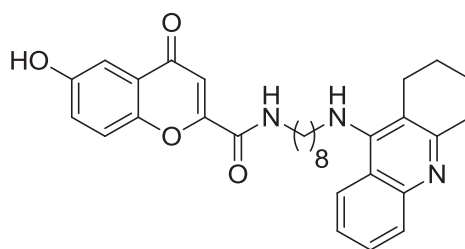


Schéma III.33. Le motif chromone et les flavonoïdes (flavone et isoflavone).

Un bon exemple de l'utilisation du motif chromone dans la cadre de la maladie d'Alzheimer est décrit par Fernández-Bachiller *et al.*<sup>360</sup> Dans cette dernière étude, des hybrides tacrine-chromone ont été synthétisés et évalués en tant qu'agents multi-cibles. La partie tacrine étant choisie pour son activité anticholinestérasique et le motif chromone pour sa capacité antioxydante et son inhibition de la  $\beta$ -sécrétase. L'hybride présenté dans le schéma III.34 a montré une grande inhibition de l'hAChE et de la  $\beta$ -sécrétase ainsi que des propriétés antioxydantes et de bonnes propriétés de pénétration du SNC (Schéma III.34).





Hybride tacrine-chromone

Schéma III.34. Structure d'un ligand multi-cibles basé sur un motif chromone selon fernández-Bachiller *et al.*

La structure chromone est ainsi d'une grande utilité dans la recherche de composés multi-cibles visant l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Pour notre concept et de manière préliminaire, nous avons voulu mettre à profit ce motif et l'utiliser dans le cadre des réactions multicomposants. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à la réaction de Passerini dans le but d'obtenir des composés ayant des propriétés antioxydantes et anticholinestérasiques. Le choix de la réaction de Passerini est intéressant car elle permet d'accéder à de nouveaux types d'adduits, différents structurellement des adduits de Ugi que nous avons vu précédemment.

Ainsi, différentes chromones et différents groupements R d'intérêt (benzyle, 3-éthyl-5-méthoxy-1*H*-indole ou 1-benzyl-4-pipéridinyle) ont été greffés sur un squelette  $\alpha$ -acyloxycarboxamide pour former les composés de la série E (Schéma III.35).

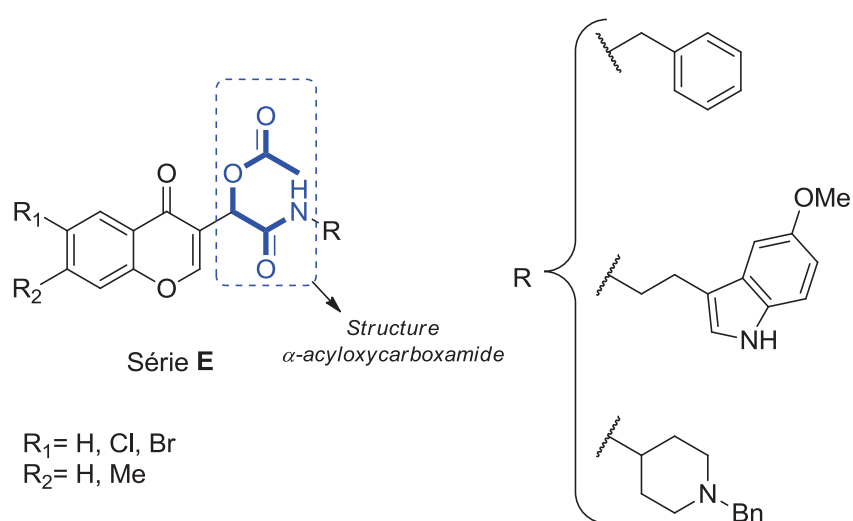


Schéma III.35. Structure générale des adduits de Passerini basés sur un motif chromone (série E).

## III.5.2 Synthèse de la série E

Nous avons vu, au chapitre II, que la réaction de Passerini est accélérée en milieu apolaire comme le dichlorométhane. Cependant, dans notre cas, 24 heures ont tout de même été nécessaires pour compléter la réaction. Ainsi, la réaction à température ambiante et pendant 24h de différents chromone-3-carboxaldéhydes commerciaux (4-oxo-4*H*-chromène-3-carboxaldéhyde, 6-bromo-4-oxo-4*H*-chromène-3-carboxaldéhyde, 6-chloro-7-méthyl-4-oxo-4*H*-chromène-3-carboxaldéhyde), de l'acide acétique, et de différents isonitriles (isocyanure de benzyle, 3-(2-isocyanoéthyl)-5-méthoxy-1*H*-indole **5**, 1-benzyl-4-isocyanopiperidine **7a**) dans le dichlorométhane fournit les dérivés chromone **E1-E9** avec des rendements variant de 34% à 74% (Schéma III.36, tableau III.21).

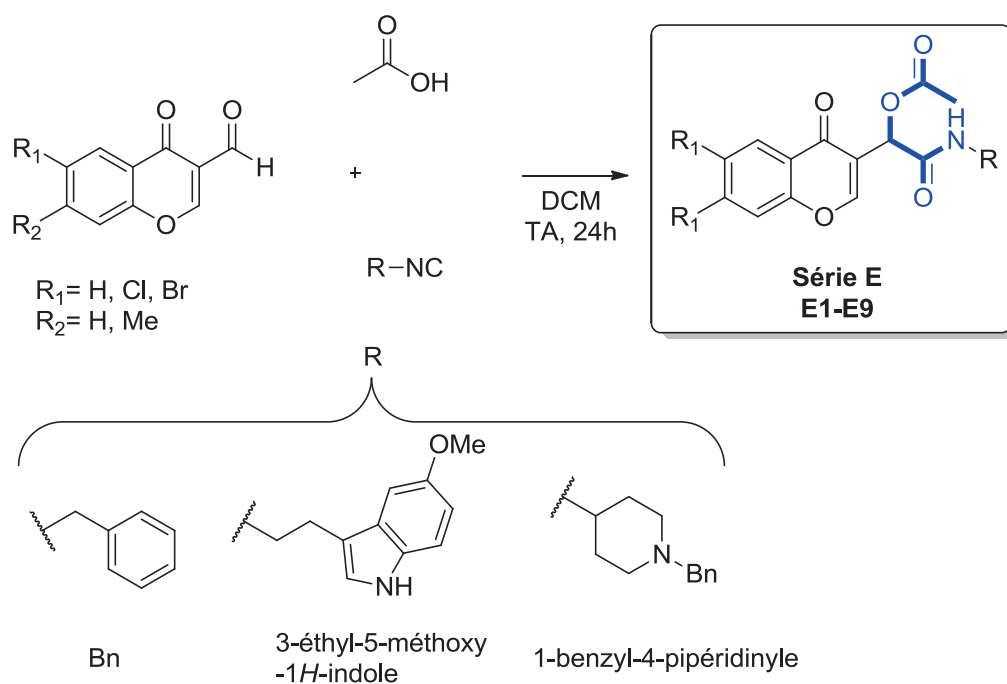


Schéma III.36. Synthèse des dérivés chromone (série E) par la réaction de Passerini.

Tableau III.21. Répertoire des rendements de la série E.

Hybride	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rendement
<b>E1</b>	Bn	H	H	74%
<b>E2</b>	Bn	Cl	Me	34%
<b>E3</b>	Bn	Br	H	69%
<b>E4</b>	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	H	H	60%
<b>E5</b>	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	Cl	Me	48%
<b>E6</b>	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	Br	H	56%
<b>E7</b>	1-benzyl-4-pipéridinyle	H	H	67%
<b>E8</b>	1-benzyl-4-pipéridinyle	Cl	Me	61%
<b>E9</b>	1-benzyl-4-pipéridinyle	Br	H	58%

### III.5.3 Evaluation de l'inhibition des cholinestérases

Le protocole d'Ellman a été utilisé pour cette évaluation sur l'*EeAChE* et la *eqBuChE*.<sup>311</sup> Le tableau III.22 résume les résultats obtenus. Nous remarquons que les dérivés de la série **E** possèdent peu ou pas d'activité sur les cholinestérases (Tableau III.22). Parmi les composés **E2**, **E3**, **E4**, **E7** et **E8**, dont nous avons pu déterminer le pourcentage d'inhibition à 1  $\mu$ M, les meilleurs résultats sont obtenus pour le composé **E3** (*EeAChE* : 18.4 %, *eqBuChE* : 28.0 %). Il n'a pas été possible de déterminer d'IC<sub>50</sub> car nous nous sommes heurtés à des problèmes de solubilité dans le milieu utilisé pour le test d'Ellman (PBS pH= 8.0).

Tableau III.22. Inhibitions de l'*EeAChE* et la *eqBuChE* par la série E.

Hybride	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<i>EeAChE</i> (%) <sup>a</sup>	<i>eqBuChE</i> (%) <sup>a</sup>
<b>E1</b>	Bn	H	H	_b	_b
<b>E2</b>	Bn	Cl	Me	14.4±0.9	24.0±4.7
<b>E3</b>	Bn	Br	H	18.4±6.2	28.0±17.8
<b>E4</b>	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	H	H	11.0±4.9	10.9±2.7
<b>E5</b>	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	Cl	Me	_b	6.7±3.6
<b>E6</b>	3-éthyl-5-méthoxy-1 <i>H</i> -indole	Br	H	_b	_b
<b>E7</b>	1-benzyl-4-pipéridinyle	H	H	14.1±9.3	16.1±12.2
<b>E8</b>	1-benzyl-4-pipéridinyle	Cl	Me	6.8±1.5	_b
<b>E9</b>	1-benzyl-4-pipéridinyle	Br	H	_b	_b

<sup>a</sup>Pourcentages d'inhibition à 1  $\mu$ M. Chaque % est la moyenne  $\pm$  SEM de quadruplicat d'au moins 3 différentes expériences. <sup>b</sup>Pas d'inhibition.

## III.5.4 Evaluation de la capacité antioxydante

A la suite des résultats d'inhibition sur la série **E**, nous avons réalisé l'évaluation de la capacité antioxydante en utilisant le test ORAC-FL décrit auparavant (cf. III.2.9.1).<sup>331,332</sup> La mélatonine et la quercétine (un flavonoïde polyhydroxylé et antioxydant puissant, valeur tirée de la publication de Dávalos *et al.*<sup>332</sup>, Schéma III.37) ont été prises comme références.

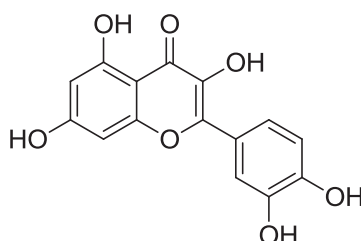


Schéma III.37. Structure de la quercétine.

Le tableau III.23 regroupe les résultats obtenus. Nous constatons que 3 tendances se dessinent. Tout d'abord, pour les composés **E1-E3** avec R= Bn, les index ORAC varient entre 1.66 et 2.55. Ces valeurs sont en moyenne inférieures aux index ORAC de la mélatonine et de la quercétine. Ensuite, pour les composés **E4-E6** comportant un fragment mélatonine, nous remarquons une forte augmentation de l'index ORAC avec des valeurs comprises entre 7.57 et 8.75, bien supérieures à la valeur de la mélatonine mais tout de même légèrement inférieures à la valeur obtenus pour la quercétine. Concernant la série **E7-E8**, possédant un fragment R= 1-benzyl-4-pipéridinyle, nous obtenons des valeurs ORAC compris entre 2.59 et 4.01.

Tableau III.23. Index ORAC des hybrides de la série **E**.<sup>a</sup>

Hybride	Index ORAC	Hybride	Index ORAC
<b>E1</b>	1.77±0.33	<b>E7</b>	2.59±0.13
<b>E2</b>	2.55±0.04	<b>E8</b>	3.78±0.23
<b>E3</b>	1.66±0.20	<b>E9</b>	4.01±0.21
<b>E4</b>	8.24±0.34	<b>Mélatonine</b>	2.45±0.09
<b>E5</b>	7.57±0.07	<b>Quercétine</b>	10.5±0.4 <sup>332</sup>
<b>E6</b>	8.75±0.12	<b>Trolox</b>	1

<sup>a</sup>Données exprimées en équivalents trolox. Moyennes ± SD de trois essais consécutifs. n.d. : non déterminée.

Maintenant si l'on compare l'effet de la substitution du fragment chromone en gardant le même fragment R, nous remarquons que pour la série **E1-E3** (R= Bn), le meilleur index ORAC est obtenu pour le composé **E2** (2.55) avec R<sub>1</sub>= Cl et R<sub>2</sub>= Me. Pour la série **E4-E6** (R= 3-éthyl-5-méthoxy-1*H*-indole), c'est le composé **E6** (8.75) avec R<sub>1</sub>= Br et R<sub>2</sub>= H. Enfin, pour la série **E7-E9**, le meilleur index ORAC est obtenu pour le dérivé **E9** avec R<sub>1</sub>= Br et R<sub>2</sub>= H (4.01). Dans les séries **E4-E6** et **E7-E9**, la substitution par un brome en position 6 donnerait lieu à un meilleur pouvoir antioxydant.

### III.5.5 Conclusion sur la série E

Comme nous l'avons dit dans l'introduction de cette partie, les résultats de la série **E**, restent préliminaires. Bien que ces composés possèdent une bonne capacité antioxydante, surtout les molécules portant un fragment mélatonine **E4-E6**, un travail d'amélioration du profil anticholinestérasique est incontournable. Dans ce sens, nous allons nous concentrer à l'avenir sur le motif *N*-benzylpipéridine, rencontré dans les dérivés **E7-E9**, en augmentant la longueur de la chaîne alkyle et en effectuant des études de docking pour en connaître la longueur optimale. L'isonitrile **7b** possédant un linker éthylène (cf. chap.III, III.1.2) va servir pour la synthèse d'autres adduits de Passerini. D'autres isonitriles possédant un motif *N*-benzylpipéridine avec des linkers plus longs sont également prévues. De plus, pour cette série, nous allons également déacétyler la fonction acyle et ainsi étudier l'effet d'un alcool secondaire sur l'inhibition des cholinestérases (Schéma III.38).

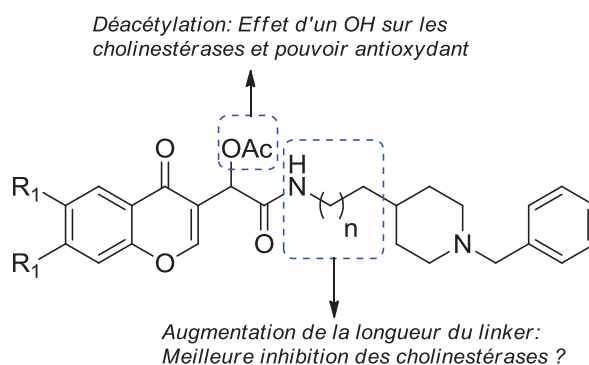


Schéma III.38. Optimisations futures des composés de la série **E** portant un fragment *N*-benzylpipéridine.

## CONCLUSION GÉNÉRALE



## Conclusion générale

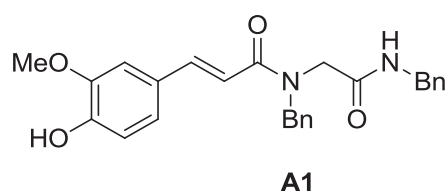
Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'application des réactions multicomposants de Ugi et de Passerini, pour la synthèse de nouveaux adduits multi-cibles basées sur différents motifs antioxydants (acides férulique/caféique/lipoïque, mélatonine, chromone) et anticholinestérasiques (tacrine, donépézil).

En premier lieu, nous avons discuté de la physiopathologie complexe de la maladie d'Alzheimer et des différentes approches thérapeutiques mono- et multi-cibles afin d'établir notre base de travail. Nous en avons conclu que l'approche multi-cibles était la meilleure stratégie à suivre pour la conception de nos différents adduits.

Nous avons évoqué en second lieu, les diverses possibilités synthétiques qu'offrent les réactions multicomposants et quelques-unes de leurs nombreuses applications en Chimie Médicinale et plus particulièrement, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

Dans une troisième partie, nous avons exposé la synthèse multicomposants et l'évaluation biologique de différents adduits de Ugi (séries **A**, **B**, **C**, **D**) et de Passerini (série **E**) résultant du mariage de la stratégie multi-cibles avec les réactions multicomposants de Ugi et de Passerini.

La première série d'adduits simples de Ugi, la série **A**, nous a servi de banc d'essai afin de nous familiariser avec la réaction de Ugi et d'avoir une évaluation préliminaire du potentiel anticholinestérasique et antioxydant. De ces résultats, nous avons identifié le composé **A1** comme de structure de départ pour la conception des autres adduits de Ugi.



**% inhibition à 1  $\mu$ M:**

*EeAChE*: 51.5%  
*eqBuChE*: 71.0%

**Pouvoir antioxydant:**

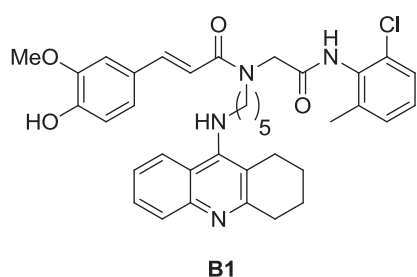
% RSA (DPPH): 29.5% à 200  $\mu$ M

Par la suite, les évaluations pharmacologiques, physico-chimiques et toxicologiques des séries **B**, **C** et **D** a permis de découvrir différents composés avec différents profils multi-



## Conclusion générale

cibles. L'hépatotoxicité des séries **B** et **C**, évaluée sur les cellules HepG2, nous montre que ces adduits de Ugi sont globalement moins toxiques que la tacrine. Par ailleurs, l'étude de la série **B** a été complétée par d'autres tests : étude conformationnelle en RMN, cinétique enzymatique, neuroprotection sur les cellules SH-SY5Y, inhibition de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, étude de docking et ADMET. De cette étude sur la série **B**, les composés **B1** et **B14** présentent les profils les mieux équilibrés.



**Viabilité cellulaire HepG2 à 1000  $\mu$ M:** 50.9 %

**Viabilité cellulaire SH-SY5Y à 10  $\mu$ M:** 90.8%

**Inhibition des cholinestérases:**

hAChE IC<sub>50</sub> = 52.3 nM et hBuChE IC<sub>50</sub> = 0.717 nM

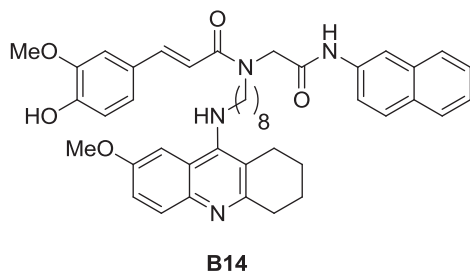
**Index antioxydant ORAC:** 6.89 éq. Trolox

**Inhibition de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> à 50  $\mu$ M:**  
73.5%

**Meilleur profil ADMET de pénétration de la BHE de la série B**

**Neuroprotection SH-SY5Y à 1  $\mu$ M:**

A $\beta$ <sub>1-42</sub>: 52.3% // O/R: 30.5% // H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 30.5%



**Viabilité cellulaire HepG2 à 1000  $\mu$ M:** 59.4 %

**Viabilité cellulaire SH-SY5Y à 10  $\mu$ M:** 95.1%

**Inhibition sélective de la hBuChE:** IC<sub>50</sub> = 68.2 nM

**Index antioxydant ORAC:** 4.29 éq. Trolox

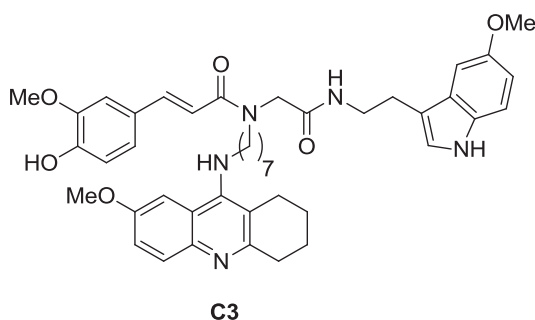
**Inhibition de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> à 50  $\mu$ M:**  
65.6%

**Neuroprotection SH-SY5Y à 1  $\mu$ M:**

A $\beta$ <sub>1-40</sub>: 74.7% // A $\beta$ <sub>1-42</sub>: 46.3% // O/R: 40.0% // H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 52.7%

Dans la série **C**, l'hétérotrimère **C3** est le meilleur antioxydant et le moins toxique sur les cellules HepG2 de toutes les séries testées. Il inhibe aussi efficacement les cholinestérases. Ce composé représente un bon candidat pour des tests pharmacologiques complémentaires *in vitro*, notamment en neuroprotection sur les cellules nerveuses SH-SY5Y et en inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

## Conclusion générale



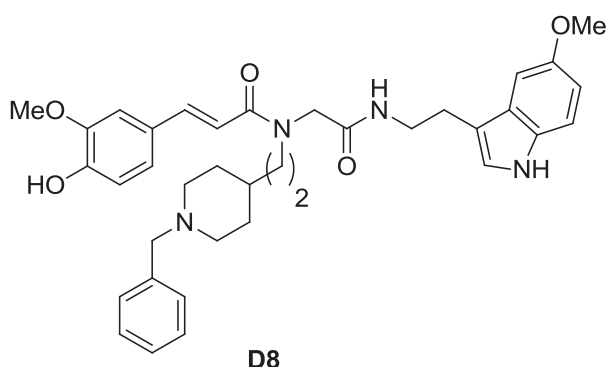
**Viabilité cellulaire HepG2 à 1000  $\mu$ M:** 68.7 %

**Inhibition des cholinestérases:**

*EeAChE*  $IC_{50}$  = 8.37 nM et *eqBuChE*  $IC_{50}$  = 2.9 nM

**Index antioxydant ORAC:** 9.11  $\text{eq. Trolox}$

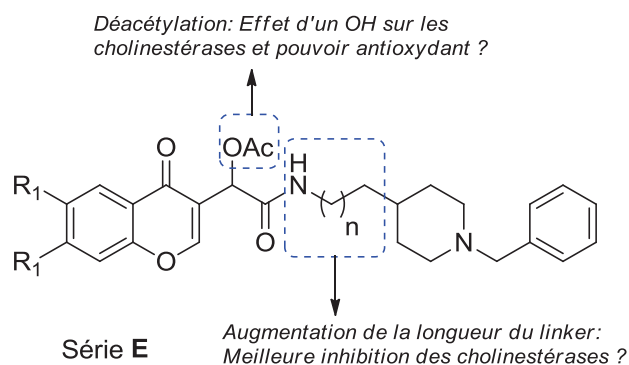
Concernant la série **D**, l'hybride **D8** semble être un candidat prometteur pour des études ultérieures notamment en neuroprotection. Il est intéressant de noter que ce composé s'est révélé être totalement sélectif de l'inhibition de la *eqBuChE*.



**Selectivité totale *eqBuChE*:**  $IC_{50}$  = 10.4 nM

**Index antioxydant ORAC:** 8.71  $\text{eq. Trolox}$

Enfin, la série **E** a été préparée et évaluée de manière préliminaire. Bien que ces dérivés de chromone présentent une bonne capacité antioxydante, leur profil anticholinestérasique doit être amélioré. Des pistes d'études futures seraient d'augmenter la longueur du linker *N*-benzylpipéridine ou d'hydrolyser l'acétyle en alcool afin d'évaluer leur effet pharmacologique sur l'inhibition des cholinestérases et le pouvoir antioxydant.



## Conclusion générale

Ce travail de thèse démontre et valide l'utilisation des réactions multicomposants, en particulier la réaction de Ugi, dans le développement de molécules multi-cibles pour le traitement potentiel de la maladie d'Alzheimer. De plus, notre étude apporte un éclairage supplémentaire pour la conception future d'autres chimiothèques de composés multi-cibles possédant une riche diversité structurale *via* les réactions multicomposants (Ugi, Passerini, Biginelli, Groebke-Blackburn-Bienaymé, etc..) et les réactions subséquentes de post-condensations.

# PARTIE EXPERIMENTALE EXPERIMENTAL PART



## Chemistry: general methods

- **Reagents and solvents :**

All reagents were pure analytical grade and used without further purification. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, used as a reaction solvent, was refluxed with P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, distilled and stored under N<sub>2</sub> prior to use.

- **Reactions conditions :**

All moisture sensitive reactions were carried out under a positive pressure of N<sub>2</sub> (balloon) in oven-dried glassware (117 °C). Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used as a drying agent. Room temperature refers to 22 °C. Reaction reflux conditions were obtained using an oil bath equipped with a standard thermometer. Solvent evaporations were performed under reduced pressure on a Büchi rotary evaporator.

- **Purification techniques and thin layer chromatography (TLC) :**

All reactions were monitored by TLC using precoated silica gel aluminium plates (Macherey-Nagel) and visualized by UV light. Flash Column chromatographies were carried out using silica gel 60 (70-230 mesh, Macherey-Nagel).

- **Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) :**

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C (JMOD sequence) NMR spectra were acquired respectively at 300 MHz and 75 MHz on a Bruker AC300 spectrometer (Bruker BioSpin). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the residual solvent signals and coupling constants (*J*) are reported in Hertz. The following abbreviations are used: Ar, aromatic; s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; quintuplet, quint.; m, multiplet.

- **In-depth NMR methods for adducts B4, B7, B13 :**

NMR spectra were recorded at 293, 303 and 313 K, using CD<sub>3</sub>OD as the solvent, on a Varian SYSTEM 500 NMR spectrometer (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz) equipped with a 5 mm HCN cold probe. Chemical shifts (δ) of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C in ppm were

determined relative to TMS. One-dimensional NMR experiments ( $^1\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$ ) were performed using standard Varian pulse sequences. Two-dimensional (2D)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR experiments (gradient correlation spectroscopy [gCOSY] and total correlation spectroscopy [TOCSY]) were carried out with the following parameters: a delay time of 1 s, a spectral width of 4,595.6 Hz in both dimensions, 2,048 complex points in  $t_2$  and  $t_4$  transients for each of 128 time increments, and a linear prediction to 256. The data were zero-filled to 2,048 x 2,048 real points. A 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  rotating frame Overhauser effect spectroscopy ROESY and NOESY experiments used the same conditions, with 64 transients per increment and a mixing time of 80 ms. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR experiments (gradient heteronuclear single quantum coherence [gHSQC] and gradient heteronuclear multiple-bond correlation [gHMBC]) used the same  $^1\text{H}$  spectral window, a  $^{13}\text{C}$  spectral window of 25,133.5 Hz, a 1-s relaxation delay, 1,024 data points, and 128 time increments, with a linear prediction to 256. The data were zero-filled to 4,096 x 4,096 real points. Typical numbers of transients per increment were 4 and 16, respectively.

- **Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) :**

Infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 65 spectrophotometer using an Attenuated Total Reflectance device (ATR,  $\nu$  in  $\text{cm}^{-1}$ ).

- **Mass spectrometry :**

High resolution mass spectra (HRMS) were obtained at Centre Commun de Spectrométrie de Masse, Lyon, France on a Bruker micrOTOF-Q II spectrometer (Bruker Daltonics) in positive ESI-TOF (electrospray ionization-time of flight).

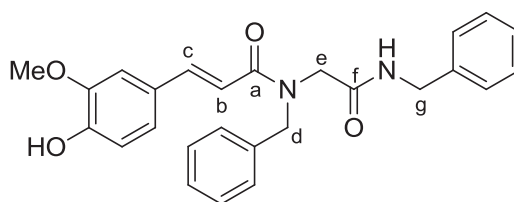
- **High-performance liquid chromatography (HPLC) for adducts B1-B14:**

The **B** series was found to be  $\geq 95\%$  pure by HPLC analysis using a Hitachi Lachrom Elite series instrument equipped with a L2400 Lachrom Elite DAD detector and a Uptisphere ODB column (4.6 mm x 100 mm,  $\phi = 3 \mu\text{m}$ ). Peaks were detected at 210 nm and the system was operated at 25 °C with a flow rate of 2 mL/min. The mobile phase was an isocratic mixture of acetonitrile and water (1:1, v/v) containing 0.1% (w/v) monopotassium phosphate.

**General procedure for the synthesis of Ugi adducts A1-A13:**

A solution of the benzylamine (1 equiv) and the corresponding aldehyde (1 equiv) in MeOH (1 M) was stirred for 15 min at room temperature. Ferulic, caffeic or lipoic acid (1 equiv) and the benzyl isocyanide (1 equiv) were then added. The reaction mixture was stirred 24h at room temperature. The crude product was either purified by flash column chromatography or filtrated to afford the corresponding Ugi adduct. Note regarding the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of compounds **A1-A13**: At 298 K, some Ugi adducts may appear as a mixture of conformers. When each peak corresponding to the same proton of each rotamers can be identified, they are listed together.

**(E)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide A1**



**A1**

$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$   
MW: 430,50 g.mol $^{-1}$

Benzylamine (110  $\mu\text{L}$ , 1 mmol) paraformaldehyde (30 mg, 1 mmol), ferulic acid (194 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu\text{L}$ , 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. Flash column chromatography Cyclo/AcOEt (7:3, v/v) afforded Ugi adduct **A1** as a white foam.

**Yield :** 71%

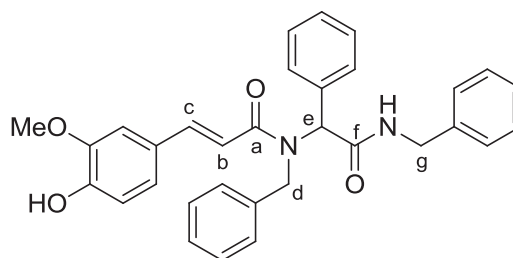
**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)**  $\delta$ = 7.70 (d,  $J$ = 15.0 Hz, 1H, H-c), 7.36-7.09 (m, 10H), 7.03-7.00 (m, 2H), 6.92-6.86 (m, 2H), 6.69 and 6.54 (d,  $J$ = 15.0 Hz, 1H, H-b), 6.06 (bs, 1H, NH), 4.80 and 4.65 (s, 2H, H-d), 4.44 and 4.31 (s, 2H, H-g), 4.12 (s, 2H, H-e), 3.86 (s, 3H, OMe).

**$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)**  $\delta$ = 169.3 (C-f), 168.5 (C-a), 148.0, 147.0, 145.0 (C-c), 136.4, 129.2, 128.8, 128.2, 127.7, 127.5, 126.9, 122.6, 115.0 (C-b), 113.8, 110.2, 56.2 (OMe), 52.8 (C-e), 51.5 (C-d), 43.6 (C-g).

**IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )**  $\nu_{\text{max}}$  : 3258, 3067, 3031, 1676, 1643, 1582, 1509.



**(*E*)-*N*-benzyl-*N*-(2-(benzylamino)-2-oxo-1-phenylethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **A2****



**A2**

$C_{32}H_{30}N_2O_4$   
MW: 506,59 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (244  $\mu$ L, 1 mmol), benzaldehyde (212 mg, 2 mmol), ferulic acid (388 mg, 2 mmol) and benzyl isocyanide (240  $\mu$ L, 2 mmol) were reacted in MeOH (2 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. The reaction mixture was evaporated then the crude was resolubilized in AcOEt and *n*-hexane was added until the appearance of a cloudy solution then cooled to 5°C. The resulting solid was filtrated, washed with *n*-hexane (10 mL) to afford the Ugi adduct **A2** as a white solid.

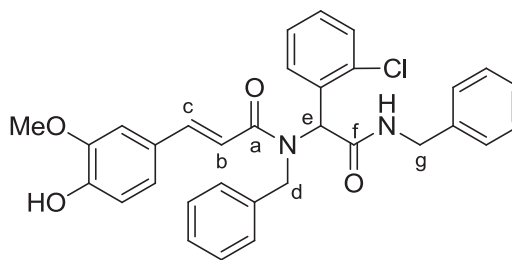
**Yield :** 62%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 7.67 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, H-c), 7.41-7.39 (m, 2H), 7.29-7.15 (m, 11H), 7.10-7.07 (m, 2H), 6.91 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.75 (m, 1H), 6.55 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, H-b), 6.23 (bs, 1H, OH), 6.11 (s, 1H, NH), 5.88-5.83 (m, 1H, H-e), 4.90 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H-d), 4.68 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H-d), 4.57-4.50 (dd, *J* = 14.5 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-g), 4.49-4.42 (dd, *J* = 14.5 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-g), 3.81 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = 169.9 (C-f), 168.8 (C-a), 147.8, 146.9, 144.2 (C-c), 138.4, 135.2, 130.0, 128.9 (2C), 128.8, 128.0 (2C), 127.6, 127.3, 122.7, 116.0, 114.9 (C-b), 109.9, 63.5 (C-e), 56.1 (OMe), 50.4 (C-d), 44.0 (C-g).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3478, 3172, 3029, 1643, 1566, 1515, 1468.

**(E)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-1-(2-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **A3****



**A3**

$C_{32}H_{29}ClN_2O_4$   
MW: 541,04 g.mol<sup>-1</sup>

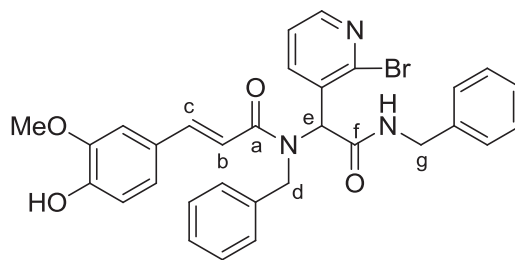
Benzylamine (1.2 mL, 4.9 mmol), 2-chlorobenzaldehyde (689 mg, 4.9 mmol), ferulic acid (952 mg, 4.9 mmol) and benzyl isocyanide (588  $\mu$ L, 4.9 mmol) were reacted in MeOH (5 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. After 24 h, a solid has precipitated, subsequently collected by suction filtration and washed with methanol (10 mL) and *n*-hexane (2x20 mL) to afford Ugi adduct **A3** as an off-white solid.

**Yield :** 48%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 7.75 (d, *J*= 15.0 Hz, 1H, H-c), 7.63 (d, *J*= 7.0 Hz, 1H), 7.27-7.07 (m, 13H), 6.94 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H), 6.85-6.79 (m, 2H), 6.60 (d, *J*= 15.0 Hz, 1H, H-b), 6.49 (bs, 1H, OH), 6.34 (m, 1H, NH), 6.08 (s, 1H, H-e), 4.91 (d, *J*= 17.7 Hz, 1H, H-d), 4.68 (d, *J*= 17.7 Hz, 1H, H-d), 4.58-4.51 (dd, *J*= 15.4 Hz, *J*= 5.4 Hz, 1H, H-g), 4.46-4.39 (dd, *J*= 15.4 Hz, *J*= 5.4 Hz, 1H, H-g), 3.82 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = 169.7 (C-f), 168.6 (C-a), 147.8, 146.9, 144.6 (C-c), 137.8, 136.0, 132.9, 131.2, 130.2, 130.0, 128.0, 128.5, 127.9, 127.8, 127.6, 127.2, 126.4, 122.7, 115.4, 114.9 (C-b), 109.4, 59.9 (C-e), 56.1 (OMe), 50.1 (C-d), 44.0 (C-g).

**(E)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-1-(2-chlorophenyl)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide A4**



**A4**

$C_{31}H_{28}BrN_3O_4$   
MW: 586,48 g.mol<sup>-1</sup>

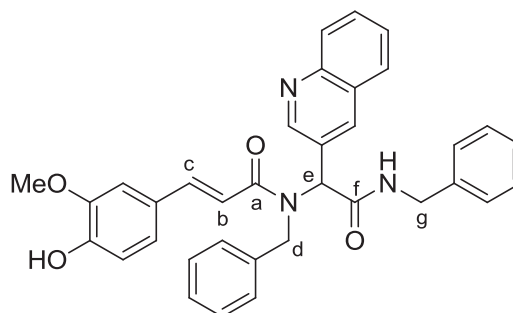
Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 2-bromonicotinaldehyde (186 mg, 1 mmol), ferulic acid (194 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. After 24 h, a solid has precipitated, subsequently collected by suction filtration and washed with methanol (10 mL) and *n*-hexane (2x20 mL) to afford Ugi adduct **A4** as an off-white solid.

**Yield : 77%**

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 8.13-8.02 (m, 2H), 7.68 (d, *J*= 15.0 Hz, 1H, H-c), 7.26-7.11 (m, 11H), 6.93 (m, 2H), 6.84-6.79 (m, 2H), 6.61 (d, *J*= 15.0 Hz, 1H, H-b), 6.40 (bs, 1H, OH), 6.20 (bs, 1H, NH), 4.91 (d, *J*= 17.0 Hz, 1H, H-d), 4.72 (d, *J*= 17.0 Hz, 1H, H-d), 4.53-4.47 (m, 1H, H-g), 4.37-4.32 (m, 1H, H-g), 3.80 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = signal of C-f missing, 168.7 (C-a), 149.8, 148.0, 146.9, 145.9, 145.2 (C-c), 139.9, 137.8, 137.2, 132.4, 128.8, 128.7, 127.9, 127.6, 126.5, 122.8, 115.0, 114.8 (C-b), 110.1, 61.5 (C-e), 56.1 (OMe), 50.3 (C-d), 44.0 (C-g).

**(E)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxo-1-(quinolin-3-yl)ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **A5****



**A5**

$C_{35}H_{31}N_3O_4$

MW: 557,64 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 3-quinolinecarboxaldehyde (157 mg, 1 mmol), ferulic acid (194 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. The reaction mixture was evaporated then the crude was triturated in Et<sub>2</sub>O with few drops of MeOH and sonicated. The resulting solid was filtrated to afford the Ugi adduct **A5** as a white solid.

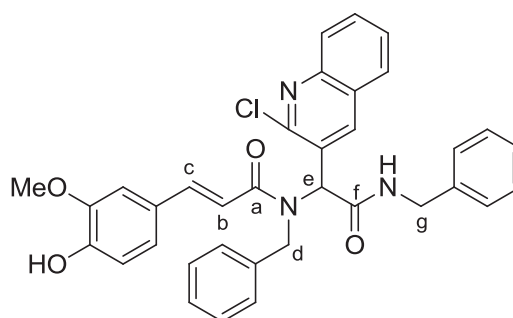
**Yield :** 53%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 8.79 (d,  $J$ = 2.2 Hz, 1H), 8.29 (bs, 1H, OH), 8.0 (d,  $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.73-7.66 (m, 3H+H-c), 7.52 (t,  $J$ = 7.0 Hz, 1H), 7.28-7.26 (m, 5H), 7.12-7.03 (m, 5H+H-b), 6.94 (dd,  $J$ = 1.5 Hz,  $J$ = 8.0 Hz, 1H), 6.84 (d,  $J$ = 8.0 Hz, 1H), 6.77 (d,  $J$ = 1.5 Hz, 1H), 6.59 (d,  $J$ = 15.4 Hz, 1H, H-b), 6.34 (bs, 1H, NH), 5.99 (s, 1H, H-e), 4.92 (d,  $J$ = 17.4 Hz, 1H, H-d), 4.77 (d,  $J$ = 17.4 Hz, 1H, H-d), 4.57 (dd,  $J$ = 14.1 Hz,  $J$ = 5.4 Hz, 1H, H-g), 4.47 (dd,  $J$ = 14.1 Hz,  $J$ = 5.4 Hz, 1H, H-g), 3.81 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = 169.2 (C-f), 169.0 (C-a), 151.6, 148.1, 147.8, 147.0, 145.1 (C-c), 137.8, 137.0, 130.2, 129.4, 129.0, 128.9, 128.3, 128.0, 127.8, 127.6, 127.2, 126.7, 122.9, 115.3, 115.0 (C-b), 110.1, 61.0 (C-e), 56.2 (OMe), 50.5 (C-d), 44.1 (C-g).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3260, 3058, 1646 1576, 1512.

**(*E*)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxo-1-(2-chloroquinolin-3-yl)ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **A6****



**A6**

$C_{35}H_{30}ClN_3O_4$

MW: 592,08 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 2-chloro-3-quinolinecarboxaldehyde (191 mg, 1 mmol), ferulic acid (194 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. The reaction mixture was evaporated then the crude was triturated in 8:2 Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v) then sonicated. The resulting solid was filtrated to afford the Ugi adduct **A5** as a white solid.

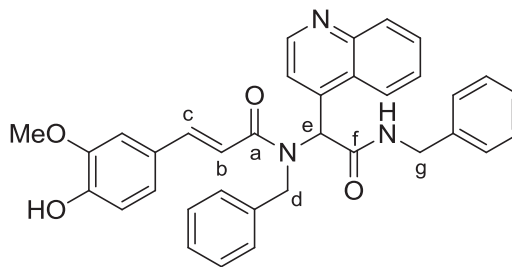
**Yield** : 10%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 8.56 (s, 1H, OH), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.74-7.68 (m, 3H+H-c), 7.54 (t, *J*= 7.0 Hz, 1H), 7.26 (m, 5H), 7.03 (m, 5H+H-b), 6.95-6.90 (m, 2H), 6.85-6.79 (m, 2H), 6.67-6.62 (m, 2H+NH), 5.82 (s, 1H), 4.94 (d, *J*= 17.1 Hz, 1H, H-d), 4.77 (d, *J*= 17.1 Hz, 1H, H-d), 4.60-4.54 (dd, *J*= 17.1, *J*= 6.3 Hz Hz, 1H, H-g), 4.46-4.40 (dd, *J*= 17.1 Hz, *J*= 6.3 Hz, H-g), 3.83 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = 169.2 (C-f), 168.9 (C-a), 148.1, 147.5, 147.0, 145.2, 137.5, 137.3, 131.3, 129.0, 128.8, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 127.6, 127.5, 127.2, 127.0, 126.78, 126.7, 126.7, 122.9, 115.3, 115.0 (C-b), 110.2, carbon signal of C-e missing, 56.2 (OMe), 50.2 (C-d), 44.2 (C-g).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3224, 3065, 1658, 1644, 1574, 1515, 1405.

**(E)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxo-1-(quinolin-4-yl)ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **A7****



**A7**

$C_{35}H_{31}N_3O_4$

MW: 557,64 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 4-quinolinecarboxaldehyde (157 mg, 1 mmol), ferulic acid (194 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. The reaction mixture was evaporated then the crude was resolubilized in AcOEt and *n*-hexane was added until the appearance of a cloudy solution then cooled to 5°C. The resulting solid was filtrated, washed with *n*-hexane (10 mL) to afford the Ugi adduct **A7** as a white solid.

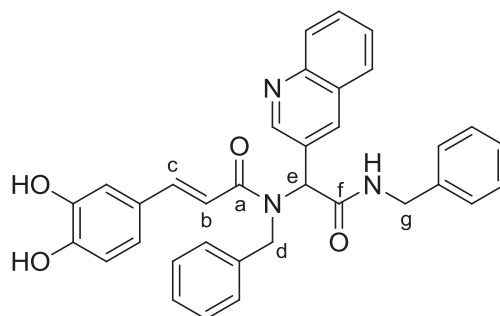
**Yield :** 30%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 8.77 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.02-7.97 (m, 2H), 7.75 (d, *J*= 15.0 Hz, H-c), 7.69-7.64 (m, 2H), 7.57-7.52 (t, *J*= 7.5 Hz, 1H), 7.32-7.19 (m, 6H) 6.94-6.82 (m, 5H), 6.75 (s, 1H), 6.70-6.68 (m, 2H), 6.59-6.54 (d, *J*= 15.0 Hz, 1H), 6.44-6.41 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 5.97 (bs, 1H, OH), 4.94 (d, *J*= 18.1 Hz, 1H, H-d), 4.77 (d, *J*= 18.1 Hz, 1H, H-d), 4.64-4.57 (dd, *J* = 15.0 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-g), 4.48-4.41 (dd, *J*= 15.0 Hz, *J*= 6.0 Hz, 1H, H-g), 3.80 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = 169.3 (C-f), 168.7 (C-a), 150.0 , 148.6 , 148.1 , 147.0 , 145.1 (C-c), 140.7, 138.0, 137.5, 130.7, 130.0, 129.0, 128.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 127.1, 126.4, 126.2, 123.6, 123.0, 122.2, 115.2, 115.0 (C-b), 109.9, carbon signal of C-e missing, 56.2 (OMe), 49.9 (C-d), 44.2 (C-g).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{max}$  : 3450, 3242, 3070, 1673, 1636, 1554, 1509, 1422.

**(E)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxo-1-(quinolin-3-yl)ethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide **A8****



**A8**

$C_{34}H_{29}N_3O_4$   
MW: 543,61 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 3-quinolinecarboxaldehyde (157 mg, 1 mmol), caffeic acid (180 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. The reaction mixture was evaporated then the crude was triturated in 8:2 Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v) then sonicated. The resulting solid was filtrated to afford the Ugi adduct **A8** as a white solid.

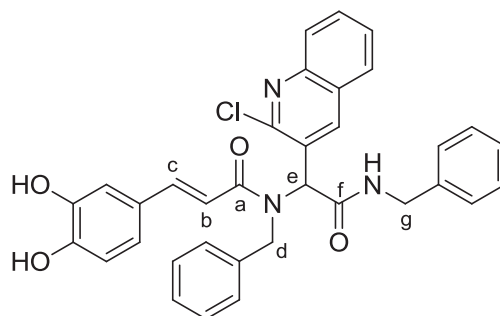
**Yield :** 17%

**<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*6, 300 MHz)**  $\delta$ = 8.84 (s, 1H), 8.27-8.22 (m, 3H+2OH), 8.03 (d,  $J$ = 6.0 Hz, 1H), 7.93 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 1H), 7.83 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 1H), 7.70 (dd,  $J$ = 7 Hz,  $J$ = 1.2 Hz, 1H), 7.63-7.52 (m, 2H, CH<sub>arom</sub> +Hc), 7.31-7.19 (m, 5H), 7.08-6.99 (m, 6H), 6.89 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 1H), 6.76 (m, 2H, CH<sub>arom</sub>+Hb), 6.53 (s, 1H, H-e), 5.12 (d,  $J$ = 20.0 Hz, 1H, H-d), 4.86 (d,  $J$ = 20.0 Hz, 1H, H-d), 4.52 (dd,  $J$ = 20.0 Hz,  $J$ = 6.2 Hz, 1H, H-g), 4.42 (dd,  $J$ = 20.0 Hz,  $J$ = 6.2 Hz, 1H, H-g).

**<sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*6, 75 MHz)**  $\delta$ = 170.1 (C-f), 168.8 (C-a), 153.0, 148.5, 148.3, 146.3, 144.5 (C-c), 140.2, 139.9, 137.4, 137.4, 137.3, 137.3, 130.6, 130.5, 129.9, 129.3, 129.1, 128.7, 128.6, 128.5, 127.9, 127.6, 127.5, 122.3, 116.5, 116.4, 115.2 (C-b), carbon signal of C-e missing, 50.4 (C-d), 44.1 (C-g).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{max}$  : 3355, 3022, 1674, 1634, 1499, 1419.

**(*E*)-*N*-benzyl-*N*-(2-(benzylamino)-1-(2-chloroquinolin-3-yl)-2-oxoethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide **A9****



**A9**

$C_{34}H_{28}ClN_3O_4$   
MW: 578,06 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 2-chloro-3-quinolinecarboxaldehyde (191 mg, 1 mmol), caffeic acid (180 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. After 24 h, a solid has precipitated, subsequently collected by suction filtration and washed with methanol (2 mL) Et<sub>2</sub>O (10 mL), and *n*-hexane (10 mL) to afford Ugi adduct **A9** as an off-white solid.

**Yield :** 62%

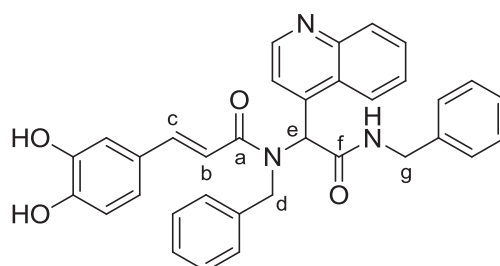
**<sup>1</sup>H NMR (Acetone-*d*6, 300 MHz)**  $\delta$ = 8.35 (s, 1H), 8.22-8.14 (m, 1H), 7.92 (m, 1H), 7.79-7.72 (m, 2H), 7.67-7.59 (m, 2H), 7.32-7.22 (m, 4H), 7.08-6.91 (m, 7 H), 6.84-6.79 (m, 3H), 5.13 (d, *J*= 19.2 Hz, 1H), 4.89 (d, *J*= 19.2 Hz, 1H), 4.58-4.50 (dd, *J*= 15.2 Hz, *J*= 7.1 Hz, 1H, H-g), 4.34-4.27 (dd, *J*= 15.2 Hz, *J*= 7.1 Hz, 1H, H-g).

**<sup>13</sup>C NMR (Acetone-*d*6, 75 MHz)**  $\delta$ = 169.8 (C-f), 168.6 (C-a), 152.2, 148.3, 148.0, 146.3, 144.7 (C-c), 140.7, 140.7, 131.7, 129.7, 129.3, 129.0, 128.9, 128.7, 128.7, 128.2, 127.9, 127.4, 127.2, 122.4, 116.5, 116.3, 115.2 (C-b), 60.2 (C-e), 50.4 (C-d), 44.1 (C-g).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3244, 3030, 1677, 1638, 1564, 1510, 1413.



**(E)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxo-1-(quinolin-4-yl)ethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide **A10****



**A10**

$C_{34}H_{29}N_3O_4$   
MW: 543,61 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 4-quinolinecarboxaldehyde (157 mg, 1 mmol), ferulic acid (194 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. After 24 h, a solid has precipitated, subsequently collected by suction filtration and washed with methanol (2 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), and *n*-hexane (10 mL) to afford Ugi adduct **A10** as an off-white solid.

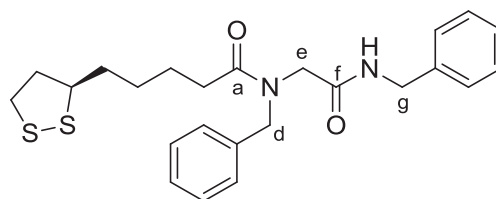
**Yield :** 51%

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 9.38 (bs, 1H, OH), 9.15 (bs, 1H, OH), 8.97 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.73 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.72-7.60 (m, 2H), 7.55 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.35-7.23 (m, 6H), 6.90-6.62 (m, 9H), 5.11 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, H-d), 4.78 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, H-d), 4.39 (dd, *J* = 15.1 Hz, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-g), 4.27 (dd, *J* = 15.1 Hz, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-g)

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = 169.0 (C-f), 167.0 (C-a), 149.6, 147.7, 147.5, 145.3, 143.5 (C-c), 141.89, 138.7, 137.9, 129.4, 129.0, 128.1, 127.3, 127.2, 126.9, 126.7, 126.6, 126.2, 125.9, 125.5, 123.6, 121.4, 120.9, 115.5, 114.3 (C-b), 56.0 (C-e), 48.5 (C-d), 42.4 (C-g).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3494, 3271, 3030, 1694, 1636, 1575, 1508, 1427.

**(R)-N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxoethyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide A11**



**A11**

$C_{24}H_{30}N_2O_2S_2$   
MW: 442,64 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), paraformaldehyde (30 mg, 1 mmol), lipoic acid (206 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. Flash column chromatography Cyclo/AcOEt (7:3, v/v) afforded Ugi adduct **A11** as a sticky yellow oil.

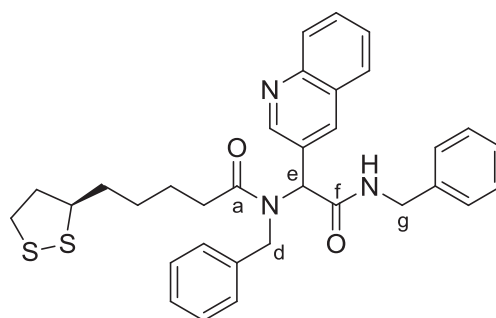
**Yield :** 70%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)**  $\delta$ = 7.38-7.14 (m, 10H), 6.68 and 6.60 (t,  $J$ = 5.4 Hz, 1H, NH), 4.66 and 4.61 (s, 2H, H-b), 4.41 and 4.32 (d,  $J$ = 5.4 Hz, 2H, H-g), 4.00 and 3.93 (s, 2H, H-e), 3.53 (quint.,  $J$ = 7.2 Hz, 1H), 3.21-3.05 (m, 2H), 2.47-2.25 (m, 3H), 1.94-1.81 (m, 1H), 1.70-1.61 (m, 4H), 1.42 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)**  $\delta$ = 174.4 (C-f), 169.1 (C-a), 136.0, 129.2, 128.9, 128.7, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 126.7, 56.5, 52.8, 50.7, 43.6, 40.4, 38.7, 34.9, 32.9, 29.1, 25.1.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{max}$  : 3296, 3061, 2923, 1639, 1538, 1358.

**N-benzyl-N-(2-(benzylamino)-2-oxo-1-(quinolin-3-yl)ethyl)-5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide A12**



**A12**

$C_{33}H_{35}N_3O_2S_2$   
MW: 569,78 g.mol<sup>-1</sup>

Benzylamine (110  $\mu$ L, 1 mmol), 3-quinolinecarboxaldehyde (30 mg, 1 mmol), lipoic acid (206 mg, 1 mmol) and benzyl isocyanide (120  $\mu$ L, 1 mmol) were reacted in MeOH (1 mL) according

to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. The reaction mixture was evaporated then the crude was triturated in Et<sub>2</sub>O with few drops of MeOH and sonicated to afford after filtration Ugi adduct **A12** as a white solid.

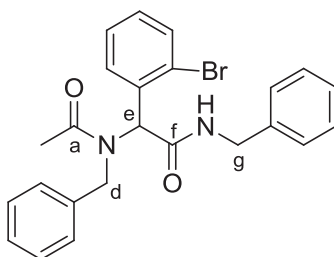
**Yield :** 40%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** δ= 8.73 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.24 (s, 1 H), 8.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.71-7.67 (m, 2H), 7.55-7.50 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.34-7.24 (m, 5H), 7.12-7.08 (m, 3H), 6.97-6.95 (m, 2H), 6.43 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 6.14 (s, 1H, H-e), 4.77 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, H-d), 4.63 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H, H-d), 4.56-4.50 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-g), 4.48-4.41 (dd, *J* = 14.8 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-g), 3.56-3.47 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.20-3.05 (m, 2H), 2.48 (m, 3H), 1.91-1.80 (m, 1H), 1.72-1.58 (m, 4H), 1.45-1.36 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)** δ= 175.0 (C-f), 169.0 (C-a), 151.4, 147.5, 137.7, 136.9, 130.1, 129.0, 128.7, 128.6, 128.0, 127.7, 127.6, 127.3, 127.1, 126.1, 121.9, 118.1, 60.5, 56.3, 50.2, 43.8, 40.2, 38.4, 34.6, 33.7, 29.7, 28.8, 24.9.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub> : 3296, 3061, 2923, 1639, 1538, 1358.

***N*-benzyl-2-(*N*-benzylacetamido)-2-(2-bromophenyl)acetamide **A13****



**A13**

C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
MW: 451,36 g.mol<sup>-1</sup>

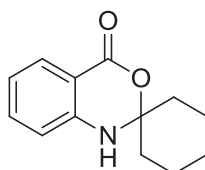
Benzylamine (546 μL, 5 mmol), 2-bromonicotinaldehyde (930 mg, 5 mmol), acetic acid (286 μL, 5 mmol) and benzyl isocyanide (609 μL, 1 mmol) were reacted in MeOH (5 mL) according to the general procedure for the synthesis of Ugi adducts **A1-A13**. After 24 h, a solid has precipitated which was subsequently collected by suction filtration and washed with methanol (5 mL) and *n*-hexane (15 mL) to afford Ugi adduct **A13** as an off-white solid.

**Yield :** 24%

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** δ= 8.17 (m, 1H), 8.00 (m, 1H), 7.34-7.04 (m, 11H), 6.33 (m, 1H, NH), 6.19 (s, 1H, H-e), 4.75-4.58 (m, 2H, H-d), 4.51-4.34 (m, 2H, H-g), 2.20 (s, 3H, Me).

## General procedure for the synthesis of tacrine and 7-methoxytacrine derivatives

### Spiro[2*H*-3,1-benzoxazine-2,1'-cyclohexan]-4(1*H*)-one **1a**.



**1a**

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>

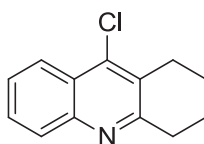
MW: 217,26 g.mol<sup>-1</sup>

A suspension of anthranilic acid (6.0 g, 43.8 mmol) and cyclohexanone (1.2 equiv., 5.5 mL, 52.6 mmol) in toluene (12 mL) was heated to reflux (Dean-Stark apparatus) until one equivalent of water (*ca.* 1 mL) was removed (2 h). After cooling, the precipitated solid was filtered, washed with 20 mL of toluene and 20 mL of ethanol. The latter filtrate was concentrated under reduced pressure and the resulting solid was recrystallized in toluene (15 mL). The solids were gathered to afford the product **1a** as short light yellow needles.

**Yield :** 61%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)** δ= 7.66 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.75 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.76-1.68 (m, 2H), 1.61-1.53 (m, 4H), 1.49-1.44 (m, 1H), 1.42-1.34 (m, 1H).

### 9-Chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine **2a**.



**2a**

C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClN

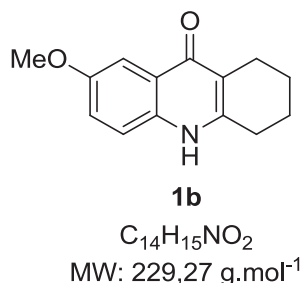
MW: 217,69 g.mol<sup>-1</sup>

A mixture of spiro[2*H*-3,1-benzoxazine-2,1'-cyclohexan]-4(1*H*)-one **1a** (4.2 g, 19.1 mmol) in phosphorus oxychloride (4.2 equiv., 7.5 mL, 80.0 mmol) was refluxed for 2 h. After cooling to room temperature, the solution was added dropwise to a solution of KOH in iced water (75 mL, 9.5 M) under prompt stirring. After the addition was complete, a yellow solid had precipitated and the supernatant pH was 10-11. Afterward, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (4x50 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to afford the product **2a** as a yellow solid.

**Yield :** 93%

**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$ = 8.11 (d,  $J$ = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$ = 7.9 Hz, 1H), 7.76 (t,  $J$ = 7.9 Hz, 1H), 7.65 (t,  $J$ = 7.9 Hz, 1H), 3.03 (m, 2H), 2.94 (m, 2H), 1.89-1.85 (m, 4H).

**7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9(10*H*)-one **1b**.**

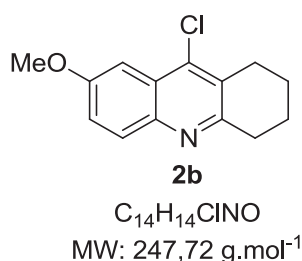


A mixture of *p*-anisidine (0.10 mol, 13.5 g), 2-ethoxycarbonylcyclohexanone (1.1 equiv., 0.11 mol, 18.7 g) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.12 equiv., 0.3 g, 0.00016 mol) in toluene (300 mL) was heated to reflux (Dean-Stark apparatus) for 8 h to remove the water. Evaporation of the toluene gave the crude enaminoester which was dissolved in warm diphenyl ether. The flask was fitted with a Dean-Stark trap to remove ethanol and the mixture was heated to reflux for 1 h. After cooling at room temperature, *n*-hexane was added. The precipitated solid was collected by filtration and washed with additional *n*-hexane. Recrystallization from dimethylformamide (50 mL) gave the product **1b** as a light yellow solid.

**Yield :** 75%

**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$ = 11.29 (s, 1H), 7.47-7.41 (m, 2H), 7.22 (dd,  $J$ = 9.0 Hz,  $J$ = 2.3 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.69 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 1.73 (m, 4H).

**9-Chloro-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine **2b**.**



A solution of 7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9(10*H*)-one **1b** (10 g, 44 mmol) in phosphorus oxychloride (60 mL, 0.64 mmol, 14.6 equiv.) After cooling to room temperature, the mixture was added dropwise on 500 g of crushed ice and stirred. After 1 h at room temperature, the mixture was basified with 25% ammonium hydroxide then filtered. The solid was washed with water and dried under reduced pressure. Recrystallization from methanol (20 mL) gave compound **2b** (4.4 g, 40%) as a light yellow solid.

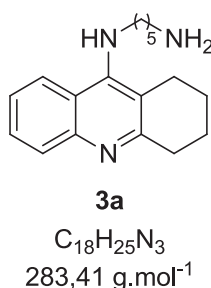
**Yield :** 40%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$ = 7.87 (d, *J*= 9.1 Hz, 1H), 7.39 (d, *J*= 2.6 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J*= 9.1 Hz, *J*= 2.6 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.09 (s, 2H), 3.01 (s, 2H), 1.94 (m, 4H).

### General procedure for the synthesis of the tacrine linkers 3a-h

9-Chlorotacrines **2a-b** (1 equiv), alkylenediamine (3 equiv) and pentan-1-ol (3 mL) were reacted and heated to reflux for 18h. The reaction was cooled to room temperature, diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL), and washed with a 10% (w/v) aqueous KOH solution (2x50 mL) and water (2x50 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to afford the crude product which was purified by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1, v/v) to afford the products **3a-h**.

#### *N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-yl)pentane-1,5-diamine **3a**.

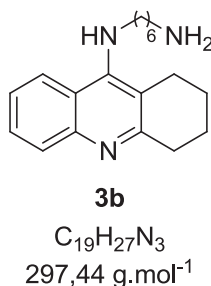


Compound **3a** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (1.0 g, 4.59 mmol, 1 equiv.), 1,6-diaminopentane (1.6 mL, 13.78 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), compound **3a** as a yellow oil.

**Yield :** 63%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ = 7.95 (d, *J*= 9.2 Hz, 1H), 7.92 (d, *J*= 9.2 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J*= 8.3 Hz, *J*= 1.2 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J*= 8.3 Hz, *J*= 1.2 Hz, 1H), 4.00 (bs, 1H), 3.52-3.47 (m, 2H), 3.07 (m, 2H), 2.72-2.68 (m, 4H), 1.94 (m, 4H), 1.73-1.63 (m, 4H), 1.53-1.40 (m, 4H).

#### *N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-yl)hexane-1,6-diamine **3b**.



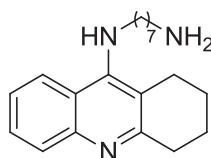
Compound **3b** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (0.5 g, 2.3 mmol, 1 equiv.), 1,6-

diaminohexane (0.8 g, 6.89 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), compound **3b** as a yellow oil which solidify on standing.

**Yield :** 66%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 7.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H), 3.97 (bs, 1H), 3.48 (m, 2H), 3.06 (m, 2H), 2.71 (m, 4H), 1.92 (m, 6H), 1.71-1.62 (m, 2H), 1.49-1.32 (m, 6H).

***N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-yl)heptane-1,7-diamine 3c.**



**3c**

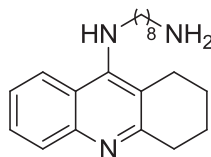
C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>  
311,46 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **3c** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (0.5 g, 2.3 mmol, 1 equiv.), 1,7-diaminoheptane (0.9 g, 6.89 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), compound **3c** as a yellow oil.

**Yield :** 66%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 3.98 (bs, 1H), 3.48 (m, 2H), 3.09-3.05 (m, 2H), 2.71-2.65 (m, 4H), 1.95-1.90 (m, 4H), 1.67 (m, 6H), 1.45-1.33 (m, 6H)

***N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine 3d.**



**3d**

C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>  
325,49 g.mol<sup>-1</sup>

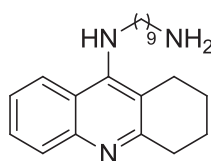
Compound **3d** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (1.0 g, 4.0 mmol, 1 equiv.), 1,8-diaminooctane (1.7 g, 12.1 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after

purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), compound **3d** as a yellow oil.

**Yield : 58%**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 7.95 (d, *J*= 8.2 Hz, 1H), 7.90 (d, *J*= 8.2 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J*= 8.2 Hz, *J*= 1.2 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J*= 8.2 Hz, 1.2 Hz, 1H), 3.95 (bs, 1H), 3.47 (m, 2H), 3.06 (m, 2H), 2.71-2.64 (m, 4H), 1.67-1.60 (m, 6H), 1.49-1.31 (m, 12H).

***N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-yl)nonane-1,9-diamine **3e**.**



**3e**

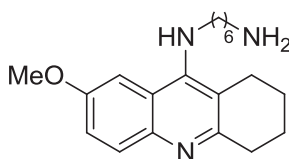
C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>  
339,52 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **3e** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (1.0 g, 4.6 mmol, 1 equiv.), 1,9-diaminononane (2.2 g, 12.1 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), compound **3e** (914 mg, 59%) as a yellow oil.

**Yield : 59%**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 7.96 (d, *J*= 8.2 Hz, 1H), 7.92 (d, *J*= 8.2 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J*= 8.2 Hz, *J*= 1.2 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J*= 8.2 Hz, *J*= 1.2 Hz, 1H), 3.98 (bs, 1H), 3.49 (m, 2H), 3.07 (m, 2H), 2.71-2.65 (m, 4H), 1.92 (m, 4H), 1.70-1.61 (m, 6H), 1.45-1.29 (m, 10H).

***N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hexane-1,6-diamine **3f**.**



**3f**

C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O  
327,46 g.mol<sup>-1</sup>

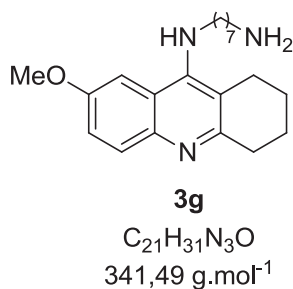
Compound **3f** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine (1.0 g, 4.0 mmol, 1 equiv.), 1,6-diaminohexane (1.4 g, 12.1 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), the compound **3f** as a yellow oil.



**Yield :** 55%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 7.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.27-7.23 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.77 (bs, 1H), 3.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.05 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 2.68 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.92 (m, 4H), 1.67 (quint., *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.49-1.34 (m, 8H).

***N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)heptane-1,7-diamine 3g.**

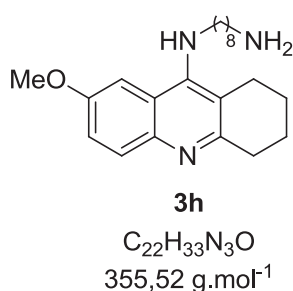


Compound **3g** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine (1.0 g, 4.0 mmol, 1 equiv.), 1,7-diaminoheptane (1.8 g, 12.1 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), compound **3g** as a yellow oil.

**Yield :** 64%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.27-7.22 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.74 (bs, 1H), 3.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 2.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.92 (m, 4H), 1.71-1.57 (m, 6H), 1.45-1.33 (m, 6H).

***N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine 3h.**



Compound **3h** was prepared as described for the synthesis of the tacrine linkers **3a-h**. The reaction of 9-Chloro-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine (1.0 g, 4.0 mmol, 1 equiv.), 1,8-diaminooctane (1.7 g, 12.1 mmol, 3 equiv.) and pentan-1-ol (3 mL) afforded, after purification by flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (7:3:0.1), compound **3h** as a yellow oil.

**Yield :** 54%

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 7.85 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H), 7.27-7.23 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.80 (bs, 1H), 3.41 (t, *J*= 7.0 Hz, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 2.68 (t, *J*= 7.0 Hz, 2H), 1.92 (m, 6H), 1.66 (quint., *J*= 7.0 Hz, 2H), 1.45-1.30 (m, 10H).

**General procedure for the synthesis of *N*-formamides 4, 6a-b.**

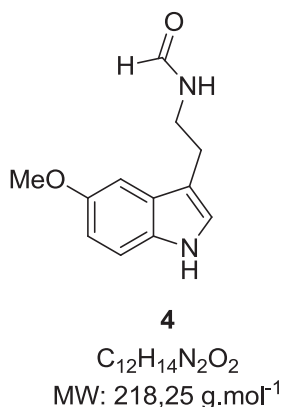
**Method A:**

A suspension of the commercially available amine was stirred in ethyl formate (in excess) at room temperature for 5 days. Then, the mixture was filtered, washed with *n*-hexane and dried under reduced pressure to afford the corresponding *N*-formamide.

**Method B:**

A suspension of the commercially available amine was stirred in ethyl formate (in excess) at reflux for 2 h. Then, the mixture was evaporated under reduced pressure to afford the corresponding *N*-formylamide.

***N*-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)formamide 4.**



The *N*-formamide **4** was obtained as an off-white solid following the **method A** of *N*-formylation with 5-methoxytryptamine (2.70 g, 14.09 mmol) as starting material in 10 mL of ethyl formate.

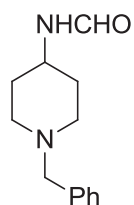
**Yield :** 59%

***R<sub>f</sub>*** = 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 8.13 (s, 1H), 8.03-7.92 (m, 1H), 7.27 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H), 7.03-6.97 (m, 2H), 6.88 and 6.87 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H), 5.61 (bs, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.68-3.62 and 3.55-3.49 (q, *J*= 6.6 Hz, 2H), 3.00-2.92 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 161.3, 123.1, 112.8, 112.7, 112.4, 112.2, 100.8, 100.7, 56.2, 38.4, 25.4.

***N*-(1-benzylpiperidin-4-yl)formamide 6a:**



**6a**

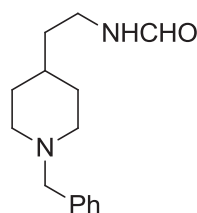
$C_{12}H_{18}N_2$   
MW: 190,28

The *N*-formamide **6a** was obtained as yellow oil following the **method B** of *N*-formylation with 1-benzylpiperidin-4-amine (1.0 g, 5.25 mmol) as starting material in 10 mL of ethyl formate.

**Yield :** quantitative

**$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$ = 8.06 (s, 1H), 7.29-7.21 (m, 5H), 6.24 (d,  $J$ = 7.5 Hz, 1H), 3.92-3.79 (m, 1H), 3.47 (s, 2H), 2.82-2.78 (m, 1H), 2.10 (td,  $J$ = 2.7 Hz,  $J$ = 11.0 Hz, 2H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.66-1.42 (m, 2H).

***N*-(2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethyl)formamide 6b:**



**6b**

$C_{15}H_{22}N_2O$   
MW: 246,35

The *N*-formamide **6b** was obtained as yellow oil following the **method B** of *N*-formylation with 2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethanamine (2.0 g, 9.16 mmol) as starting material in 10 mL of ethyl formate.

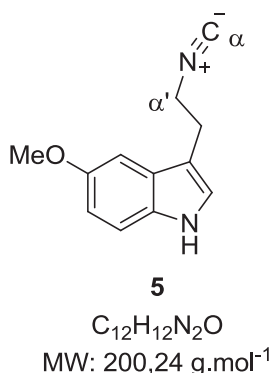
**Yield :** quantitative

**$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$ = 8.11 (s, 1H), 7.29-7.26 (m, 5H), 5.91 (bs, 1H), 3.52 (s, 2H), 3.32-3.18 (m, 2H), 2.9 (d,  $J$ = 11.5 Hz, 2H), 1.96 (t,  $J$ = 11.5 Hz, 2H), 1.67-1.60 (m, 2H), 1.46-1.44 (m, 2H), 1.29-1.19 (m, 3H).

### General procedure for the synthesis of isocyanides **5**, **7a-b**.

A solution of the corresponding *N*-formamide **4**, **6a-b** (1 equiv) in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (~ 0.2 M) was reacted with Burgess reagent (1.5 equiv) which was added in one portion. The solution was heated at reflux under a N<sub>2</sub> atmosphere for 1h, then cooled, diluted with additional CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), washed with water (2 x 20 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated under reduced pressure to dryness, and the crude product was purified by flash column chromatography (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> for isocyanide **5**, 1:1 *n*-hexane/AcOEt for isocyanides **7a-b**) to afford the desired isocyanide.

### 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5**.



Compound **5** was prepared as described for the synthesis of the isocyanides. The reaction of *N*-(2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)formamide **4** (1.50 g, 6.87 mmol, 1 equiv) with Burgess reagent (2.45 g, 10.3 mmol, 1.5 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) afforded, after purification by flash column chromatography (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), isocyanide **5** as a non-odorous light yellow wax.

**Yield** : 69%

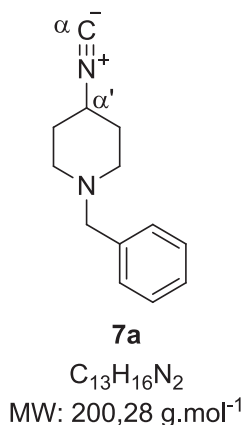
**R<sub>f</sub>** = 0.69 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 8.05 (br s, 1H), 7.25 (d, *J*= 8.7 Hz, 1H), 7.08 (d, *J*= 2.4 Hz, 1H), 6.97 (d, *J*= 2.4 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J*= 8.7 Hz, *J*= 2.4 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.64 (t, *J*= 7.0 Hz, 2H, α'), 3.12 (t, *J*= 7.0 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ= 156.2 (t, *J*= 4.9 Hz, 1C, Cα), 154.4, 131.6, 127.4, 123.5, 112.6, 112.3, 110.9, 100.4, 56.2, 42.4 (t, *J*= 6.2 Hz, 1C, Cα'), 26.0.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub> : 3408, 2917, 2830, 2148, 1623, 1584, 1484, 1454, 1440.

**1-benzyl-4-isocyanopiperidine 7a.**



Compound **7a** was prepared as described for the synthesis of the isocyanides. The reaction of *N*-(1-benzylpiperidin-4-yl)formamide **6a** (1.0 g, 4.5 mmol, 1 equiv) with Burgess reagent (1.64 g, 6.8 mmol, 1.5 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) afforded, after purification by flash column chromatography (1:1 *n*-hexane/AcOEt), isocyanide **7a** as a slightly odorous yellow oil.

**Yield:** 40%

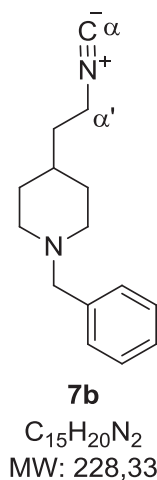
**R<sub>f</sub>** 0.52 (*n*-hexane/AcOEt 1:1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 7.29 (m, 5H), 3.62 (bs, 1H), 3.48 (s, 2H), 2.62 (m, 2H), 2.30 (m, 2H), 1.91-1.84 (m, 4H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 155.3 (t, *J* = 5.1 Hz, 1C, Cα), 138.1, 129.1, 128.4, 127.2, 63.0, 49.9 (Cα'), 32.0.

**IR (ATR, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3028, 2929, 2809, 2769, 2138, 1801, 1742, 1493, 1453.

**1-benzyl-4-(2-isocyanoethyl)piperidine 7b.**



Compound **7b** was prepared as described for the synthesis of the isocyanides. The reaction of *N*-(1-benzylpiperidin-4-yl)formamide **6a** (1.0 g, 4.05 mmol, 1 equiv) with Burgess reagent

(1.45 g, 6.01 mmol, 1.5 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) afforded, after purification by flash column chromatography (1:1 *n*-hexane/AcOEt), isocyanide **7b** as a slightly odorous yellow oil.

**Yield:** 34%

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 7.30-7.26 (m, 5H), 3.50 (s, 2H), 3.44-3.40 (m, 2H), 2.89 (d, *J*= 11.4 Hz, 2H), 1.97 (t, *J*= 11.4 Hz, 2H), 1.68-1.64 (m, 4H), 1.49 (m, 1H), 1.34-1.22 (m, 2H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 156.0 (Cα), 138.5, 129.4, 128.4, 127.2, 63.6, 53.7, 39.4 (t, *J*= 6.3 Hz, 1C, Cα'), 35.7, 32.7, 31.8.

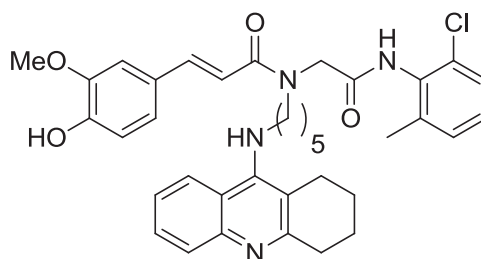
**IR (ATR, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3027, 2921, 2800, 2759, 2146.

### General procedure for the U-4CR of the B, C, D series.

A solution of the corresponding amine (1 equiv) and paraformaldehyde (1 equiv) in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ([C]~0.08-0.1 M, 3:1, v/v) was stirred for 1h at room temperature. Ferulic or lipoic acid (1 equiv) and the corresponding isocyanide (1 equiv) were then added, and the reaction was stirred 24h at room temperature. The crude product was either purified by flash column chromatography or filtrated to afford the corresponding Ugi adduct. Note regarding the <sup>1</sup>H (300 MHz) and <sup>13</sup>C (75 MHz) spectra: At 298 K, some Ugi adducts may appear as a mixture of conformers. <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) and <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) relevant chemical shifts for adducts **B4**, **B7** and **B13** are reported in table 1S.

### B series

**(*E*)-*N*-(2-((2-Chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(5-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)pentyl)acrylamide **B1**.**



**B1**

C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
641,20 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)pentane-1,5-diamine **3a** (215 mg, 0.76 mmol), paraformaldehyde (22 mg, 0.76 mmol), ferulic acid (147 mg, 0.76 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (115 mg, 0.76 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded Ugi adduct **B1** as an orange foam.

**Yield:** 19%

$R_f$  0.18 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

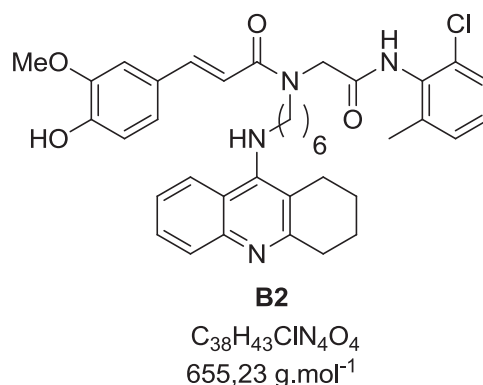
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 8.09 and 8.04 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 7.74-7.71 (m, 1H), 7.54 (d,  $J$ =6.2 Hz, 1H), 7.49 (d,  $J$ =6.2 Hz, 1H), 7.35-7.27 (m, 1H), 7.24-7.21 (m, 1H), 7.15-7.06 (m, 3H), 7.01-6.98 (m, 1H), 6.85 (d,  $J$ =15.2 Hz, 1H), 6.76 (t,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 3.83 and 3.77 (m, 3H), 3.64-3.50 (m, 4H), 2.91 (m, 2H), 2.65-2.62 (m, 2H), 2.25-2.18 (m, 3H), 1.82 (m, 4H), 1.67-1.60 (m, 4H), 1.48-1.40 (m, 2H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 170.5, 170.3, 170.1, 157.9, 154.1, 150.8, 149.6, 146.5, 145.1, 140.2, 139.9, 134.3, 133.7, 130.6, 130.3, 129.8, 129.5, 128.4, 128.3, 128.2, 126.7, 125.2, 125.0, 124.8, 124.0, 123.6, 120.7, 116.8, 115.3, 114.9, 112.2, 111.9, 56.6, 52.1, 51.3, 50.7, 33.4, 32.0, 30.9, 30.0, 28.6, 26.0, 25.4, 25.2, 24.0, 23.5, 19.0.

**HPLC:**  $t_R$  = 1.84 min, 97.8%

**HRMS ESI-TOF [ $M+H$ ]<sup>+</sup>  $m/z$**  calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 641.2889, found: 641.2881.

**(*E*)-*N*-(2-((2-Chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(6-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)hexyl)acrylamide B2.**



*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hexane-1,6-diamine **3b** (206 mg, 0.69 mmol), paraformaldehyde (21 mg, 0.69 mmol), ferulic acid (134 mg, 0.69 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (97 mg, 0.69 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B2** as an orange foam.

**Yield:** 27%

$R_f$  0.16 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 8.05 (t,  $J$ =8.0 Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$ =8.0 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$ =3.3 Hz, 1H), 7.46 (d,  $J$ =3.3 Hz, 1H), 7.35-7.28 (m, 1H), 7.24-7.21 (m, 1H), 7.12-7.07 (m, 3H), 6.99 (t,  $J$ =8.0 Hz, 1H), 6.84 (d,  $J$ =15.0 Hz, 1H), 6.77-6.71 (m, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.29 (s, 1H), 3.81 and 3.78 (s, 3H), 3.58-3.49 (m, 4H), 2.90 (m, 2H), 2.66-2.62 (m, 2H), 2.23 and 2.12 (s, 3H), 1.82 (m, 4H), 1.61 (m, 4H), 1.35-1.24 (m, 4H).

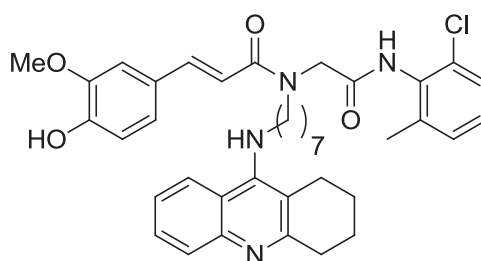
**NMR  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  = 170.4, 170.2 (2C), 170.0, 158.4, 153.9, 150.9, 149.6, 147.1, 145.2, 145.1, 140.1, 139.8, 134.3, 133.7, 130.3, 129.7, 129.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.3, 127.2, 125.0, 124.8, 124.7, 124.0, 123.6, 121.0, 116.8, 116.7, 116.5, 115.3, 114.8, 112.2, 111.8, 56.6, 52.0, 51.2, 50.8, 33.8, 32.2, 30.2, 28.7, 27.8, 27.5, 26.1, 24.1, 23.6, 19.0.

**IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )**  $\nu_{\text{max}}$  : 3198, 2932, 2858, 1683, 1642, 1578, 1511, 1452, 1423, 1364.

**HPLC:**  $t_{\text{R}}$  = 2.15 min, 96.7%

**HRMS ESI-TOF  $[M+H]^+$   $m/z$**  calcd. for  $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{ClN}_4\text{O}_4$  : 655.3046, found: 655.3031.

**(*E*)-*N*-(2-((2-Chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(7-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)heptyl)acrylamide **B3**.**



**B3**

$\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{ClN}_4\text{O}_4$   
669,25  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$N^1$ -(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)heptane-1,7-diamine **3c** (206 mg, 0.69 mmol), paraformaldehyde (21 mg, 0.69 mmol), ferulic acid (134 mg, 0.69 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (97 mg, 0.69 mmol) were reacted in  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{aqueous } 30\% \text{ NH}_3$  (92:8:0.1) afforded adduct **B3** as a yellow foam.

**Yield:** 42%

**$R_f$**  = 0.25 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{aqueous } 30\% \text{ NH}_3$  92:8:0.1)

**NMR  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  = 8.05 (t,  $J$ =9.1 Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$ =7.9 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$ =4.9 Hz, 1H), 7.46 (d,  $J$ =4.9 Hz, 1H), 7.32-7.27 (m, 1H), 7.22-7.20 (m, 1H), 7.11-7.08 (m, 3H), 6.99 (t,  $J$ =9.1 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$ =15.1 Hz, 1H), 6.77-6.71 (m, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.29 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.57-3.46 (m, 4H), 2.90 (m, 2H), 2.62 (m, 2H), 2.23 and 2.16 (m, 3H), 1.82 (m, 4H), 1.60-1.57 (m, 4H), 1.30 (m, 6H).

**NMR  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  = 170.4, 170.2, 170.1, 170.0, 158.4, 153.7, 151.0, 149.6, 147.2, 145.1, 140.1, 139.8, 134.2, 133.6, 130.3, 129.7, 129.5, 128.4, 128.3, 128.1, 127.3, 125.0, 124.7, 124.0, 123.6, 121.0, 116.8, 116.4, 115.2, 114.7, 112.2, 111.8, 56.6, 52.0, 51.2, 50.8, 33.8, 32.3, 30.2, 28.7, 27.9, 27.7, 26.1, 24.1, 23.6, 19.0.

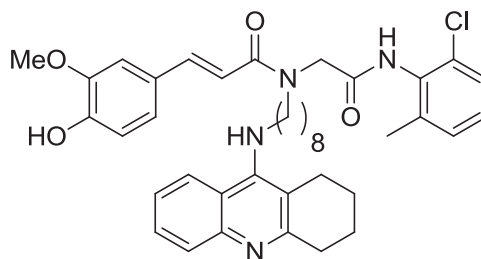


**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3234, 2928, 2855, 1676, 1642, 1567, 1511, 1421, 1367.

**HPLC:**  $t_R$  = 2.95 min, 99.3%

**HRMS ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$**  calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>46</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 669.3202, found : 669.3182.

**(E)-N-(2-((2-Chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(8-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)acrylamide B4.**



**B4**

C<sub>40</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
683,28 g.mol<sup>-1</sup>

N<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3d** (243 mg, 0.75 mmol), paraformaldehyde (22 mg, 0.75 mmol), ferulic acid (134 mg, 0.75 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (114 mg, 0.75 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B4** as an orange foam.

**Yield:** 27%

**R<sub>f</sub>** = 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 8.05 (t,  $J$ =8.0 Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$ =8.0 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$ =6.0 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$ =6.0 Hz, 1H), 7.31 (t,  $J$ =8.0 Hz, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.11-7.09 (m, 3H), 6.99 (t,  $J$ =9.2 Hz, 1H), 6.84 (d,  $J$ =15.1 Hz, 1H), 6.77-6.72 (m, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.59-3.46 (m, 4H), 2.91 (m, 2H), 2.64 (m, 2H), 2.23 and 2.17 (m, 3H), 1.83 (m, 4H), 1.60-1.56 (m, 4H), 1.26 (m, 8H).

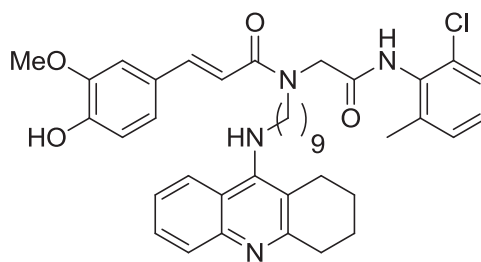
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 170.5, 170.1, 170.0, 158.5, 153.7, 151.0, 149.6, 147.3, 145.1, 140.1, 139.8, 134.3, 134.1, 133.7, 130.2, 129.7, 129.5, 128.4, 128.3, 128.1, 127.4, 125.0, 124.7, 124.0, 123.6, 121.1, 116.9, 116.8, 116.5, 115.3, 114.8, 112.3, 111.8, 56.6, 52.0, 51.2, 50.8, 33.9, 32.3, 30.3, 30.2, 28.8, 27.9, 27.6, 26.1, 24.1, 23.7, 19.0.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3193, 2927, 2854, 1676, 1642, 1578, 1511, 1452, 1365

**HPLC:**  $t_R$  = 3.63 min, 98.3%

**HRMS ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$**  calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 683.3359, found: 683.3342.

**(E)-N-(2-((2-Chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(9-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)nonyl)acrylamide B5.**



**B5**

$C_{41}H_{49}ClN_4O_4$   
697,31 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)nonane-1,9-diamine **3e** (204 mg, 0.60 mmol), paraformaldehyde (18 mg, 0.60 mmol), ferulic acid (117 mg, 0.60 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (91 mg, 0.60 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded the TFAH **B5** as an orange foam.

**Yield:** 19%

*R*<sub>f</sub> 0.29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

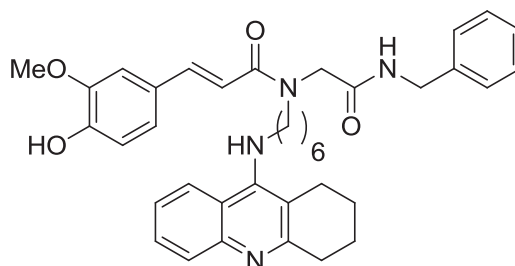
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.06 (t, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.74 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.56-7.49 (m, 2H), 7.32 (t, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.25-7.22 (m, 1H), 7.15-6.98 (m, 4H), 6.86 (d, *J*=15.0 Hz, 1H), 6.80-6.74 (m, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.34 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.62-3.60 (m, 1H), 3.53-3.44 (m, 3H), 2.93 (m, 2H), 2.66 (m, 2H), 2.26 and 2.20 (m, 3H), 1.85 (m, 4H), 1.65-1.57 (m, 4H), 1.28-1.20 (m, 10H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 170.5, 170.2, 170.0, 158.8, 153.6, 151.3, 149.7, 147.6, 145.1, 140.1, 133.7, 130.3, 130.1, 129.7, 129.5, 128.3, 128.0, 127.7, 124.9, 124.7, 124.0, 123.7, 121.2, 116.9, 116.8, 116.6, 115.2, 114.7, 112.2, 111.8, 56.6, 52.0, 51.2, 50.8, 34.0, 32.4, 30.5, 30.4, 28.0, 27.7, 26.2, 24.2, 23.7, 19.0.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 4.74 min, 96.9%

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 697.3515, found: 697.3491.

**(*E*)-*N*-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(6-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)hexyl)acrylamide **B6****



**B6**

$C_{38}H_{44}N_4O_4$   
620,78 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hexane-1,6-diamine **3b** (200 mg, 0.67 mmol), paraformaldehyde (20 mg, 0.67 mmol), ferulic acid (130 mg, 0.67 mmol) and benzyl isocyanide (82  $\mu$ L, 0.67 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B6** as a yellow foam.

**Yield:** 33%

***R*<sub>f</sub>** 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

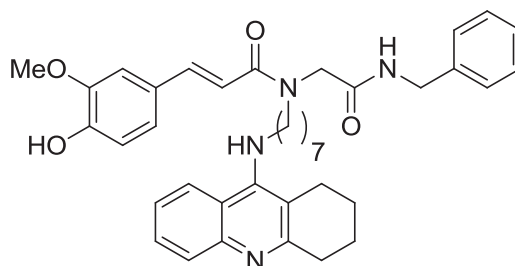
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 8.08-8.01 (m, 1H), 7.65 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.42 (d, *J*=15.0 Hz, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.20-7.08 (m, 5H), 7.00-6.85 (m, 2H), 6.78 (d, *J*=15.0 Hz, 1H), 6.69-6.61 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 4.18 (s, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.73 and 3.70 (m, 3H), 3.49 (m, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.58-2.55 (m, 2H), 1.77 (m, 4H), 1.57-1.47 (m, 4H), 1.28-1.20 (m, 6H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 171.4, 171.2, 169.9, 169.8, 157.1, 156.9, 156.8, 156.7, 154.7, 154.5, 150.6, 149.4, 145.5, 145.4, 144.9, 140.0, 131.1, 129.6, 128.6, 128.3, 128.2, 125.8, 125.6, 125.3, 125.2, 125.1, 123.7, 123.6, 123.5, 120.1, 116.7, 115.7, 115.5, 115.3, 114.9, 112.2, 112.0, 56.6, 52.2, 51.4, 50.7, 49.6, 44.3, 44.2, 44.0, 32.8, 32.1, 30.9, 30.2, 28.6, 27.7, 27.4, 25.8, 23.8, 23.2.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 1.73 min, 97.6%

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 621.3435, found : 621.3435.

**(E)-N-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(7-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)heptyl)acrylamide B7**



**B7**

$C_{39}H_{46}N_4O_4$   
634,81 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)heptane-1,7-diamine **3c** (168 mg, 0.54 mmol), paraformaldehyde (16 mg, 0.54 mmol), ferulic acid (105 mg, 0.54 mmol) and benzyl isocyanide (66  $\mu$ L, 0.67 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B7** as a yellow foam.

**Yield:** 48%

***R*<sub>f</sub>** 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 9:1:0.1);

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 8.13-8.06 (m, 1H), 7.75-7.73 (m, 1H), 7.57-7.47 (m, 2 H), 7.40-6.96 (m, 8H), 6.89-6.65 (m, 2H), 4.39 (m, 2H), 4.23 (s, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.84 and 3.80 (m, 3H), 3.55-3.44 (m, 4H), 2.96 (m, 2H), 2.72-2.70 (m, 2H), 1.89 (m, 4H), 1.62 (m, 4H), 1.34-1.29 (m, 6H);

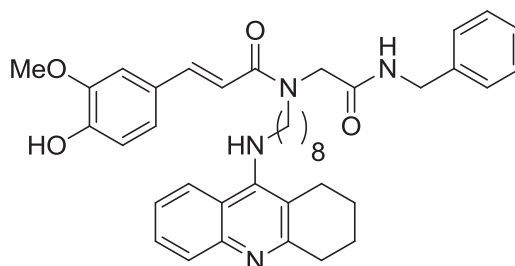
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 171.4, 171.2, 169.9, 169.8, 158.2, 153.8, 153.7, 151.3, 149.6, 146.9, 145.0, 140.0 (2C), 139.9, 130.4, 129.6, 128.7, 128.6, 128.3 (2C), 127.9, 127.1, 125.0, 124.7, 123.8, 123.6, 120.8, 116.9, 116.8, 116.3, 115.1, 114.7, 112.2, 112.1, 56.6, 52.2, 51.4, 50.7, 44.3 (2C), 44.2, 44.0, 33.6, 32.2, 30.1, 28.6, 28.3, 27.9, 27.6, 26.0, 24.0, 23.5, 23.4, 23.3;

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{max}$ : 3284, 2928, 2855, 1642, 1579, 1511, 1452, 1423.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 1.63 min, 95.1%;

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 635.3592, found: 635.3577.

**(*E*)-*N*-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(8-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)acrylamide **B8****



**B8**

$C_{40}H_{48}N_4O_4$   
648,83 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3d** (176 mg, 0.54 mmol), paraformaldehyde (16 mg, 0.54 mmol), ferulic acid (105 mg, 0.54 mmol) and benzyl isocyanide (66  $\mu$ L, 0.67 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B8** as a yellow foam.

**Yield:** 27%

***R*<sub>f</sub>** 0.31 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 9:1:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 8.28-8.20 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.49-7.44 (m, 2 H), 7.28-7.10 (m, 6H), 7.05-7.00 (m, 1H), 6.94-6.84 (m, 1H), 6.74-6.66 (m, 1H), 4.38-4.35 (m, 2H), 4.25 (s, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.83-3.71 (m, 5H), 3.58-3.53 (m, 1H), 3.48-3.44 (m, 1H), 3.19 (s, 1H), 2.95 (m, 2H), 2.66 (m, 2H), 1.90 (m, 4H), 1.74-1.54 (m, 4H), 1.33 (m, 8H).

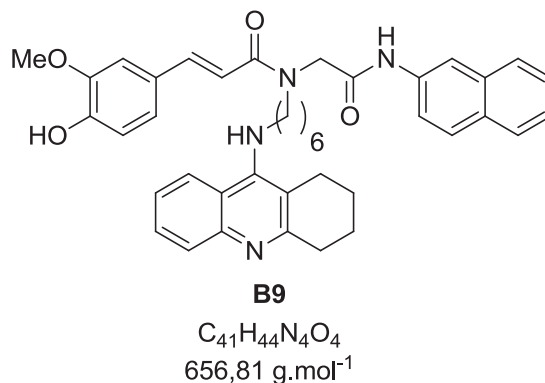
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 171.5, 171.3, 170.0 (2C), 158.7, 153.7, 151.0, 149.7, 147.5, 145.0, 140.0, 130.2, 129.8, 129.7, 128.7, 128.3, 128.1, 127.6, 124.9, 124.7, 123.8, 123.6, 121.1, 116.9, 116.8, 116.6, 115.2 (2C), 114.8, 112.2, 112.1, 56.6, 52.3, 51.4, 50.7, 44.4, 44.2, 34.0, 32.3, 30.3, 30.2, 28.7, 27.9, 27.6, 26.2, 24.1, 23.7, 23.6, 23.5.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3233, 3059, 2927, 2854, 1638, 1584, 1514, 1452, 1427 cm<sup>-1</sup>

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 2.71 min, 95.7%

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 649.3748, found : 649.3736.

**(E)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(2-(naphthalen-2-ylamino)-2-oxoethyl)-N-(6-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)hexyl)acrylamide B9**



*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hexane-1,6-diamine **3b** (200 mg, 0.67 mmol), paraformaldehyde (20 mg, 0.67 mmol), ferulic acid (130 mg, 0.67 mmol) and naphthyl isocyanide (103 mg, 0.67 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B9** (143 mg, 32%) as a brownish foam.

**Yield:** 32%

*R*<sub>F</sub> 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1).

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.17 (m, 1H), 8.09-8.02 (m, 1H), 7.71-7.64 (m, 4H), 7.54-7.50 (m, 3H), 7.38-7.32 (m, 3H), 7.09-6.69 (m, 4H), 4.42 (s, 1H), 4.26 (s, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.67-3.60 (m, 1H), 3.52-3.48 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 2.59 (m, 2H), 1.80 (m, 4H), 1.62-1.56 (m, 4H), 1.37 (m, 6H);

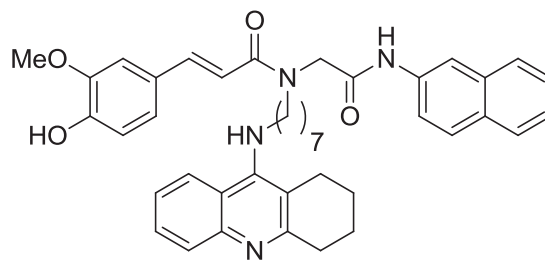
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 170.0, 169.8, 157.8, 154.1, 150.8, 149.5, 146.5, 145.2, 144.9, 137.3, 135.3, 132.3, 132.2, 130.6, 129.8, 129.7, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 127.6, 126.6, 126.4, 126.2, 126.1, 125.1, 125.0, 124.8, 123.9, 123.8, 121.3, 121.2, 120.6, 118.0, 117.9, 116.8, 116.7, 116.2, 115.6, 114.8, 112.2, 111.7, 56.6, 52.8, 52.3, 50.9, 49.6, 33.4, 32.1, 32.1, 30.9, 30.3, 28.8, 27.9, 27.7, 27.4, 25.9, 23.9, 23.4, 23.3;

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3269, 2928, 2855, 1690, 1640, 1583, 1561, 1503, 1418, 1361.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 3.31 min, 98.1%;

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 657.3435, found: 657.3434.

**(*E*)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(2-(naphthalen-2-ylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(7-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)heptyl) acrylamide **B10****



**B10**

C<sub>42</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>  
670,84 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-Tetrahydroacridin-9-yl)heptane-1,7-diamine **3c** (200 mg, 0.64 mmol), paraformaldehyde (19 mg, 0.64 mmol), ferulic acid (124 mg, 0.64 mmol) and naphthyl isocyanide (98 mg, 0.64 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B10** as an orange-brownish foam.

**Yield:** 30%

*R*<sub>f</sub> 0.19 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1);

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.17 (m, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.69 (m, 4H), 7.53-7.50 (m, 3H), 7.35-7.32 (m, 3H), 7.09-6.68 (m, 4H), 4.42 (s, 1H), 4.27 (s, 1H), 3.80 and 3.67 (s, 3H), 3.60 (m, 1H), 3.47 (m, 3H), 2.90 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 1.82 (m, 4H), 1.62-1.56 (m, 4H), 1.30-1.26 (m, 6H).

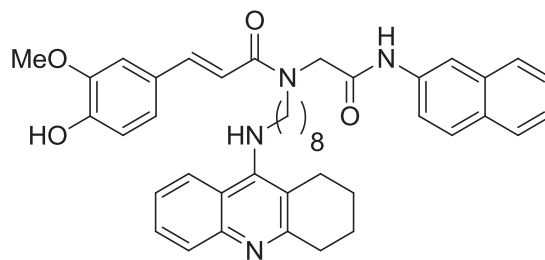
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 170.0, 169.8, 157.5, 154.2, 150.8, 149.6, 146.2, 145.2, 144.8, 144.8, 144.7, 137.3, 136.5, 135.3, 132.2, 130.8, 130.7, 129.7, 128.7, 128.2, 127.6, 126.6, 126.4, 126.3, 126.2, 125.2, 125.0, 124.6, 123.9, 123.6, 121.3, 120.4, 120.2, 118.0, 117.9, 117.7, 116.8, 116.4, 116.0, 115.6, 114.8, 113.4, 113.2, 112.3, 111.7, 56.6, 52.8, 52.3, 51.0, 33.3, 32.1, 30.9, 30.2, 29.3, 27.9, 27.7, 25.9, 23.9, 23.4, 23.3.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3280, 2927, 2854, 1690, 1639, 1583, 1560, 1503, 1432, 1361.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 4.02 min, 95.6%;

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 671.3592, found: 671.3580.

**(*E*)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(2-(naphthalen-2-ylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(8-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl) acrylamide **B11****



**B11**

$C_{43}H_{48}N_4O_4$   
684,87 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3d** (200 mg, 0.61 mmol), paraformaldehyde (18 mg, 0.61 mmol), ferulic acid (118 mg, 0.61 mmol) and naphthyl isocyanide (93 mg, 0.61 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B11** as an orange-brownish foam.

**Yield:** 18%

*R*<sub>f</sub> 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.20-8.18 (m, 1H), 8.08-8.04 (m, 1H), 7.75-7.68 (m, 4H), 7.56-7.49 (m, 3H), 7.40-7.34 (m, 3H), 7.14-6.70 (m, 4H), 4.44 (s, 1H), 4.29 (s, 1H), 3.83 and 3.69 (s, 3H), 3.64-3.59 (m, 1H), 3.50-3.45 (m, 3H), 2.93 (m, 2H), 2.65 (m, 2H), 1.85 (m, 4H), 1.65-1.56 (m, 4H), 1.27 (m, 8H);

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 170.1, 169.9, 154.0, 150.8, 150.1, 149.6, 146.9, 145.2, 144.8, 135.4, 132.3, 130.5, 129.8, 129.7, 129.6, 128.7, 128.3, 127.6, 127.0, 126.1, 125.1, 124.8, 123.6, 121.3, 121.3, 120.9, 118.2, 118.0, 116.8, 116.7, 116.4, 115.7, 114.9, 112.3, 111.7, 56.6, 52.8, 52.2, 51.0, 33.6, 32.2, 30.3, 28.8, 27.8, 27.6, 26.0, 24.1, 23.6, 23.5;

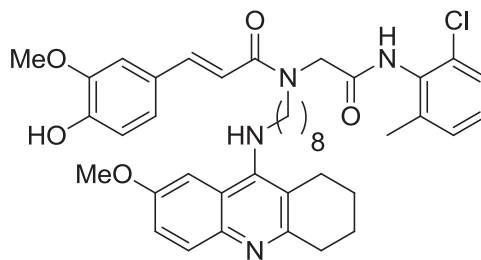
**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3200, 2928, 2856, 1689, 1638, 1560, 1504, 1431, 1352.

**HPLC:** *t*<sub>R</sub>=5.57 min, 98.9%;

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 685.3748, found: 685.3744.



**(*E*)-*N*-(2-((2-Chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(8-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)acrylamide **B12****



**B12**

$C_{41}H_{49}ClN_4O_5$   
713,30 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3h** (202 mg, 0.57 mmol), paraformaldehyde (17 mg, 0.57 mmol), ferulic acid (110 mg, 0.57 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (86 mg, 0.57 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B12** as a brownish foam.

**Yield:** 16%

*R<sub>f</sub>* 0.20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.67 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*=15.2 Hz, 1H), 7.36 (d, *J*=7.1 Hz, 1H), 7.28-7.21 (m, 2H), 7.18-7.12 (m, 3H), 7.03 (t, *J*=9.0 Hz, 1H), 6.91-6.81 (m, 1H), 6.76 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 4.46-4.32 (m, 2H), 3.88-3.72 (m, 6H), 3.63-3.40 (m, 4H), 2.93 (m, 2H), 2.73-2.71 (m, 2H), 2.26 and 2.20 (s, 3H), 1.86 (m, 4H), 1.68-1.59 (m, 4H), 1.31-1.26 (m, 8H);

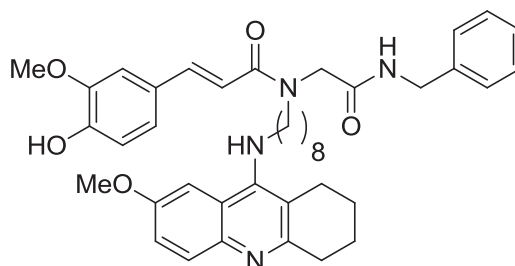
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 172.6, 170.5, 157.8, 156.7, 152.8, 150.7, 149.6, 145.1, 143.1, 140.1, 136.2, 134.3, 133.7, 130.4, 130.3, 129.8, 129.7 (2C), 129.5, 129.2, 129.1, 128.4 (2C), 124.3, 124.0, 123.8, 123.6, 122.4, 122.3, 118.1, 118.0, 116.8, 116.7, 116.3, 115.4, 115.0, 113.2, 112.3, 111.9, 103.2, 56.6, 56.3, 51.6, 51.2, 50.8, 33.8, 32.4, 30.4, 30.4, 30.2, 28.0, 27.7, 27.6, 26.4, 24.2, 23.8, 23.7, 19.0;

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3234, 2928, 2855, 1679, 1625, 1581, 1505, 1452, 1429.

**HPLC:** *t<sub>R</sub>* = 4.10 min, 95.6%

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 713.3464, found: 713.3471.

**(E)-N-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(8-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)acryl amide B13**



**B13**

$C_{41}H_{50}N_4O_5$   
678,86 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3h** (202 mg, 0.57 mmol), paraformaldehyde (17 mg, 0.57 mmol), ferulic acid (110 mg, 0.57 mmol) and benzyl isocyanide (70  $\mu$ L, 0.57 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded the adduct **B13** as a yellow foam.

**Yield:** 25%

*R<sub>f</sub>* = 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 98:2:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 7.60 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 7.46-7.39 (m, 1H), 7.28-7.25 (m, 1H), 7.21-7.19 (m, 2H), 7.16-7.11 (m, 3H), 7.07-7.05 (m, 1H), 7.02 (m, 1H), 6.97-6.93 (m, 1H), 6.88-6.59 (m, 2H), 4.31 and 4.29 (s, 2H), 4.16 (s, 1H), 4.06 (s, 1H), 3.79-3.68 (m, 6H), 3.46-3.41 (m, 2H), 3.37-3.26 (m, 2H), 2.84 (m, 2H), 2.62-2.60 (m, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.48 (m, 4H), 1.17 (m, 8H).

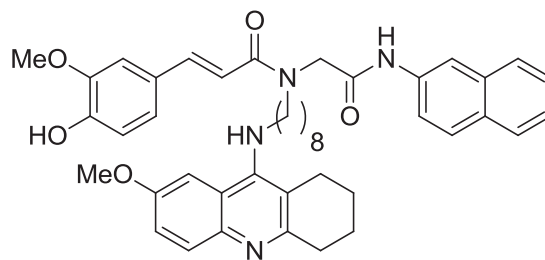
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 171.4, 171.2, 169.9 (2C), 157.7, 156.6, 152.7, 151.0, 150.9, 149.6, 145.0, 143.1, 140.0, 139.9, 129.6, 129.1, 128.6, 128.3, (2C), 128.1, 123.8, 123.6, 122.3, 122.2, 117.9, 116.9, 116.8, 115.2, 114.8, 112.2, 112.1, 103.2, 56.6, 56.2, 52.2, 51.4, 50.7, 44.3, 44.2, 44.0, 33.8, 32.4, 30.4, 30.3, 30.3, 30.2, 28.7, 28.0, 27.6, 26.3, 24.2, 23.8.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{max}$  : 3282, 2927, 2854, 1643, 1581, 1511, 1453, 1428.

**HPLC:** *t<sub>R</sub>*=3.37 min, 96.0%

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 679.3854, found : 679.3868.

**(E)-3-(Hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(8((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)-N-(2-naphthalen-2-ylamino)2-oxoethyl)acrylamide B14**



**B14**

$C_{44}H_{50}N_4O_5$   
714,89 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3h** (209 mg, 0.59 mmol), paraformaldehyde (18 mg, 0.59 mmol), ferulic acid (114 mg, 0.59 mmol) and naphthyl isocyanide (90 mg, 0.59 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **B14** as a brownish foam.

**Yield:** 18%

*R*<sub>f</sub> 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.18 (m, 1H), 7.75-7.63 (m, 4H), 7.55-7.48 (m, 2H), 7.38-7.29 (m, 3H), 7.24-7.18 (m, 1H), 7.11-6.67 (m, 4H), 4.42-4.17 (m, 2H), 3.85-3.67 (m, 6H), 3.61-3.33 (m, 4H), 2.89 (m, 2H), 2.67-2.65 (m, 2H), 1.83 (m, 4H), 1.62-1.55 (m, 4H), 1.32-1.25 (m, 8H).

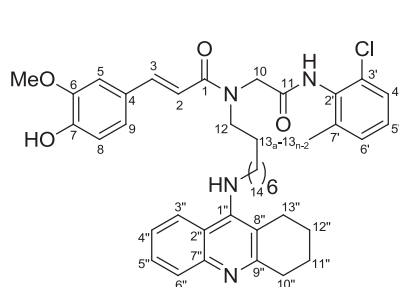
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 170.0, 169.8, 157.8, 156.3 (2C), 152.9, 150.8, 149.6, 149.0, 145.2, 144.8, 137.3, 136.5, 135.3, 132.2, 129.8, 129.7, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.3, 127.6 (2C), 126.1, 124.6, 123.8, 123.6, 122.3, 122.2, 121.3, 121.2, 121.1, 120.2, 118.0, 117.9, 116.8, 116.6, 116.2, 114.8, 113.3, 113.2, 112.3, 111.7, 103.3, 56.6, 56.3, 52.3, 51.7, 51.0, 33.6, 33.6, 32.4, 30.4, 30.3, 28.0, 27.7, 27.6, 26.3, 24.1, 23.7.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3286, 2928, 2854, 1690, 1627, 1583, 1560, 1503, 1451, 1430.

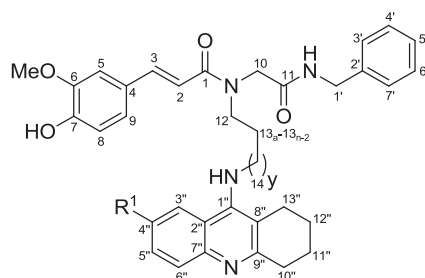
**HPLC:** *t*<sub>R</sub> = 6.53 min, 97.4%

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>44</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 715.3854, found: 715.3830.

## Partie expérimentale – Experimental part



**B4**



R<sup>1</sup> = H, y = 5, **B7**

R<sup>1</sup> = OMe, y = 6, **B13**

Fragment	<b>B4</b>		<b>B7</b>		<b>B13</b>	
	Major (ppm)	Minor (ppm)	Major (ppm)	Minor (ppm)	Major (ppm)	Minor (ppm)
1	169.92	170.06	169.85	169.95	169.84	169.92
2	114.64 (6.89)	115.10 (6.79)	114.69 (6.86)	115.06 (6.68)	114.75 (6.84)	115.10 (6.66)
3	144.98 (7.55)	144.96(7.51)	144.91 (7.51)	144.94 (7.49)	144.87 (7.48)	144.90 (7.46)
4	128.17	128.02	128.17	128.07	128.16	128.12
5	112.01	111.56	111.99	111.83	112.02	111.84
6	150.82	150.82	150.71	150.66	150.60	150.54
7	149.47	149.47	149.43	149.41	149.41	149.37
8	116.68	116.57	116.64	116.56	116.62	116.54
9	123.49	123.89	123.46	123.71	123.42	123.66
10	51.01 (4.33)	51.87 (4.47)	51.20 (4.12)	52.09 (4.23)	51.20 (4.10)	52.09 (4.21)
11	170.39	170.20	171.34	171.15	171.33	171.15
12	50.64 (3.62)	49.48	50.58 (3.55)	49.46	50.60 (3.52)	49.45 (3.45)
13a—13n-2	a		a		a	
14	49.60 (3.52)	49.67	49.57 (3.46)	49.55	49.62 (3.44)	
OMe-6	56.44	56.44	56.43	56.41	56.44	56.40
1'	---	---	44.07 (4.39)	44.21 (4.36)	44.07 (4.37)	43.84 (4.37)
2'	139.99	139.73	139.85	139.78	139.86	139.77
3'	133.54	133.56	128.50	128.55	128.50	128.54
4'	123.49	123.89	129.50	129.55	129.50	129.53
5'	129.40	129.62	128.16	128.05	128.16	128.05
6'	130.17	130.21	129.50	129.55	129.50	129.53
7'	133.94	134.11	128.50	128.55	128.50	128.54
Me-7'	18.85	18.87	-	-	-	-
1''	153.70	153.76	153.76	153.85	152.73	152.79
2''	120.87	120.87	120.80	120.84	122.17	122.20
3''	124.85	124.85	124.61	124.69	102.93	102.93
4''	124.61	124.65	124.89	124.86	157.64	157.64
5''	130.17	130.12	130.24	130.17	117.82	117.82
6''	127.16	127.10	127.03	127.03	128.50	128.50
7''	147.08	147.05	146.95	146.95	142.84	142.84
8''	116.39	116.34	116.33	116.33	122.17	122.17
9''	158.34	158.29	158.24	158.20	156.41	156.41
10''	33.69	33.77	33.61	33.74	33.55	33.62
11''	23.52	23.42	23.50	23.40	23.64	23.68
12''	23.99	23.99	23.94	23.94	24.07	24.09
13''	26.01	26.01	26.01	26.07	26.24	26.28
OMe-4''	-	-	-	-	56.09	56.09

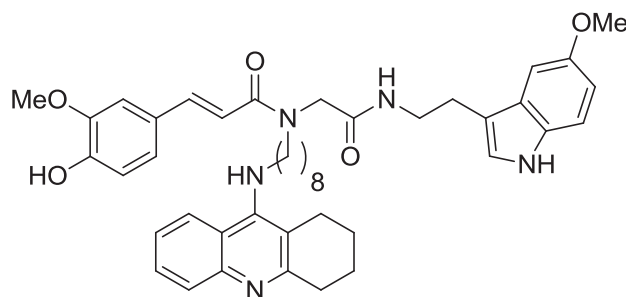
\* <sup>1</sup>H values in parentheses

a 32-27 ppm

Table 1S. <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) and relevant <sup>1</sup>H (in brackets, 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) chemical shifts for adducts **B4**, **B7** and **B13** (major and minor conformers).

## C Series

**(*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-*N*-(8-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl) acrylamide **C1****



**C1**

$C_{44}H_{53}N_5O_5$   
731,92 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3d** (205 mg, 0.58 mmol), formaldehyde (17 mg, 0.58 mmol), ferulic acid (112 mg, 0.58 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (116 mg, 0.58 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **C1** as a yellow foam.

**Yield:** 45%

*R*<sub>f</sub> 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

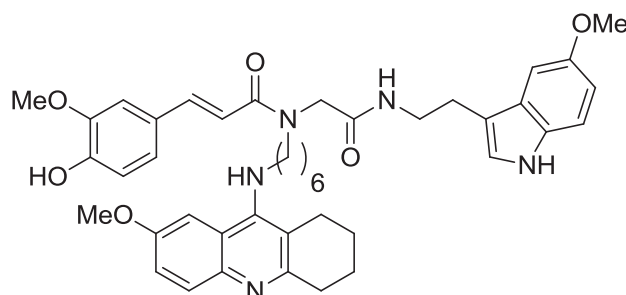
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.08-6.95 (m, 4H), 6.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.72-6.65 (m, 2H), 4.13-3.96 (m, 2H), 3.82-3.73 (m, 6H), 3.55-3.44 (m, 4H), 3.35 (m, 2H), 2.92-2.88 (m, 4H), 2.63 (m, 2H), 1.83 (m, 4H), 1.64-1.46 (m, 4H), 1.26-1.21 (m, 8H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 171.4, 171.2, 170.0, 169.8, 158.3, 155.1, 153.8, 151.0, 149.6, 147.0, 145.0 (2C), 133.5, 130.5, 129.3, 129.2, 128.2, 128.1, 127.2, 127.1, 125.0, 124.8, 124.5, 124.3, 123.7, 123.6, 120.9, 116.9, 116.8, 116.3, 115.3, 114.7, 113.1, 113.0, 112.6, 112.3, 112.0, 101.6, 101.5, 56.6, 56.5, 52.3, 51.4, 50.5, 41.5, 41.0, 33.7, 32.3, 30.3, 30.3, 30.0, 27.9, 27.5, 26.5, 26.3, 26.2, 26.0, 24.0, 23.6, 23.5.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3315, 2927, 1642, 1584, 1500, 1451, 1433.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>44</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: 732.4119, found: 732.4120.

**(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(6-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)hexyl)-N-(2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl) amino)-2-oxoethyl) acrylamide**  
**C2**



**C2**

C<sub>43</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>  
733,89 g.mol<sup>-1</sup>

N<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hexane-1,6-diamine **3f** (208 mg, 0.64 mmol), formaldehyde (19 mg, 0.64 mmol), ferulic acid (124 mg, 0.64 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1H-indole **5** (128 mg, 0.64 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **C2** as an orange foam.

**Yield:** 31%

**R<sub>f</sub>** 0.21 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

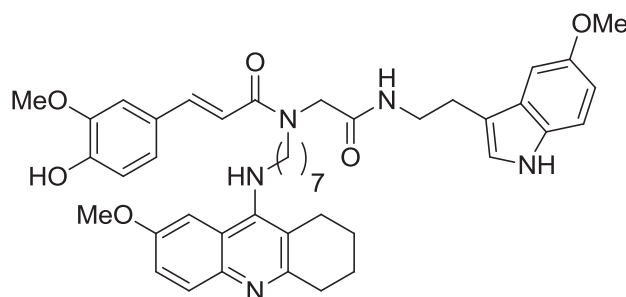
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.61 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.04-6.97 (m, 4H), 6.78-6.65 (m, 3H), 4.13 (s, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.85-3.70 (m, 9H), 3.52-3.45 (m, 4H), 3.35 (m, 2H), 2.88 (m, 4H), 2.61-2.59 (m, 2H), 1.80 (m, 4H), 1.61 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.35-1.26 (m, 4H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 176.1, 171.4, 171.2, 170.0, 169.8, 157.9, 155.1, 154.8, 154.6, 154.1, 153.9, 150.5, 150.4, 149.4, 149.3, 149.1, 145.0, 144.8, 141.3, 140.5, 133.5, 129.4, 129.3, 128.4, 128.3, 127.0, 126.7, 124.5, 124.3, 123.9, 123.7, 123.5, 123.2, 123.0, 122.7, 121.2, 121.1, 116.7, 116.5, 116.4, 116.2, 115.5, 114.8, 113.1, 113.0, 112.8, 112.6, 112.2, 112.0, 111.4, 103.8, 101.5, 56.6, 56.5, 56.3, 52.3, 51.4, 50.5, 41.5, 32.4, 32.2, 30.1, 28.6, 27.7, 27.4, 26.4, 26.2, 26.0, 23.8, 23.2.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub> : 3279, 2930, 2856, 1641, 1581, 1510, 1483, 1449, 1367, 1270, 1213.

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 734.3912, found: 734.3880.

**(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(7-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)heptyl)-N-(2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl) amino) -2-oxoethyl)acrylamide **C3****



**C3**

$C_{44}H_{53}N_5O_6$   
747,92 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)heptane-1,7-diamine **3g** (206 mg, 0.60 mmol), formaldehyde (18 mg, 0.60 mmol), ferulic acid (117 mg, 0.60 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (120 mg, 0.60 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **C3** as an orange foam.

**Yield:** 31%

*R<sub>f</sub>* = 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

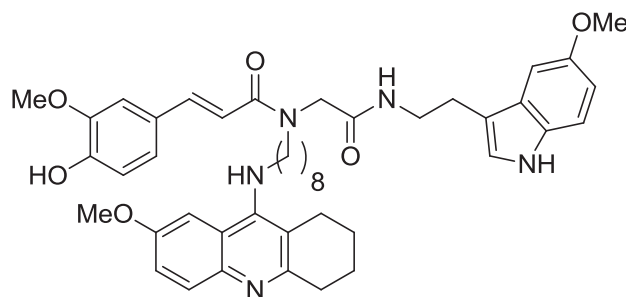
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.65 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.07-6.99 (m, 4H), 6.76-6.66 (m, 3H), 4.11 (s, 1H), 4.01 (s, 1H), 3.85-3.72 (m, 9H), 3.51-3.46 (m, 2H), 3.40-3.38 (m, 2H), 2.89 (m, 4H), 2.64 (m, 2H), 1.81 (m, 4H), 1.55-1.44 (m, 4H), 1.35-1.23 (m, 8H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 173.5, 171.4, 171.2, 170.0, 169.8, 157.7, 156.4, 155.1, 152.8, 152.8, 150.9, 150.7, 149.6, 145.0, 144.9, 142.9, 133.5, 129.3, 128.9, 128.1, 124.5, 124.3, 123.7, 123.6, 122.2, 117.8, 116.8 (2C), 115.3, 114.7, 113.1, 113.0, 112.6, 112.3, 112.0, 103.2, 101.6, 101.5, 56.6, 56.5, 56.2, 52.3, 51.4, 50.5, 41.5, 41.0, 33.6, 32.4, 30.3, 30.2, 30.0, 28.5, 28.1, 28.0, 27.6, 26.2, 24.1, 23.7.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3300, 2929, 2855, 1643, 1580, 1504, 1483, 1449, 1364, 1271, 1216.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>44</sub>H<sub>54</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: 748.4069, found: 748.4043.

**(*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(8-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)-*N*-(2-((5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)acrylamide **C4****



**C4**

C<sub>45</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>  
761,95 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3h** (200 mg, 0.56 mmol), formaldehyde (17 mg, 0.56 mmol), ferulic acid (108 mg, 0.56 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (112 mg, 0.56 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> (92:8:0.1) afforded adduct **C4** as an yellow foam.

**Yield:** 40%

***R*<sub>f</sub>** 0.14 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aqueous 30% NH<sub>3</sub> 92:8:0.1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.38-7.36 (m, 1H), 7.25-7.10 (m, 3H), 7.06-6.98 (m, 3H), 6.81-6.69 (m, 3H), 4.13 (s, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.89-3.77 (m, 9H), 3.53-3.41 (m, 4H), 3.36 (m, 2H), 2.94-2.89 (m, 4H), 2.73 (m, 2H), 1.87 (m, 4H), 1.65-1.45 (m, 4H), 1.35-1.21 (m, 8H).

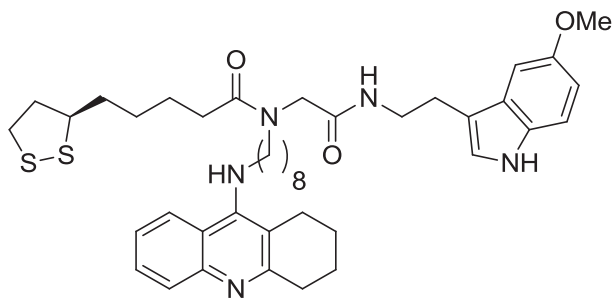
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 171.4, 171.2, 170.0, 169.8, 158.3, 155.1, 153.8, 151.0, 149.6, 147.0, 145.0 (2C), 133.5, 130.5, 129.3, 129.2, 128.2, 128.1, 127.2, 127.1, 125.0, 124.8, 124.5, 124.3, 123.7, 123.6, 120.9, 116.9, 116.8, 116.3, 115.3, 114.7, 113.1, 113.0, 112.6, 112.3, 112.0, 101.6, 101.5, 56.6, 56.5, 52.3, 51.4, 50.5, 41.5, 41.0, 33.7, 32.3, 30.3, 30.3, 30.0, 27.9, 27.5, 26.5, 26.3, 26.2, 26.0, 24.0, 23.6, 23.5.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3274, 2928, 1644, 1625, 1581, 1507, 1486, 1451.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>45</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: 762.4225, found: 762.4232.



**(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl) ethyl)amino)-2-oxoethyl)-N-(8-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)pentanamide C5**



**C5**

C<sub>43</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
744,06 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3d** (198 mg, 0.56 mmol), formaldehyde (18 mg, 0.56 mmol), lipoic acid (115 mg, 0.56 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (112 mg, 0.56 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **C5** as a yellow foam.

**Yield:** 39%

*R<sub>f</sub>* = 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

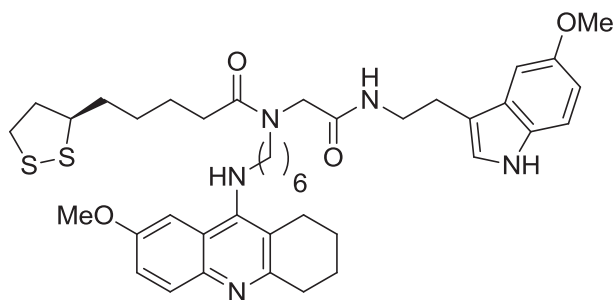
**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** *v*<sub>max</sub>: 3249, 2925, 2852, 1640, 1562, 1519, 1482, 1436, 1357, 1299, 1213.

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.47-7.43 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.97-6.94 (m, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.93-3.91 (m, 2H), 3.78-3.72 (m, 5H), 3.51-3.43 (m, 3H), 3.24-3.17 (m, 2H), 3.10-2.96 (m, 3H), 2.91- 2.81 (m, 3H), 2.58 (m, 2H), 2.38-2.28 (m, 2H), 2.18-2.13 (m, 2H), 1.85-1.68 (m, 6H), 1.63-1.26 (m, 16H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 182.0, 176.0, 175.8, 171.3, 170.8, 157.1, 157.0, 155.1, 153.2, 153.1, 141.5, 141.4, 133.5, 133.3 (2C), 129.3, 126.1 (2C), 124.5 (2C), 121.9, 121.8, 188.0 (2C), 113.7, 113.6, 113.1, 112.9, 112.6, 101.6, 101.5, 57.9, 57.8, 56.5, 52.1, 50.7, 50.6, 41.4, 39.4, 38.7, 36.0, 35.9, 33.9, 33.6, 31.8 (2C), 30.5, 30.3, 30.2 (2C), 30.0, 29.7, 28.4, 27.8 (2C), 27.7, 27.4, 26.4, 26.3, 26.2, 25.2, 23.3, 22.3.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>: 744.3976, found: 744.3948.

**(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(6-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro acridin-9-yl)amino)hexyl)-N-(2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl) pentanamide C6.**



**C6**

C<sub>41</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
746,04 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hexane-1,6-diamine **3f** (176 mg, 0.54 mmol), formaldehyde (16 mg, 0.54 mmol), lipoic acid (111 mg, 0.54 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (108 mg, 0.54 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **C6** as an yellow foam.

**Yield:** 61%

*R<sub>f</sub>* 0.36 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

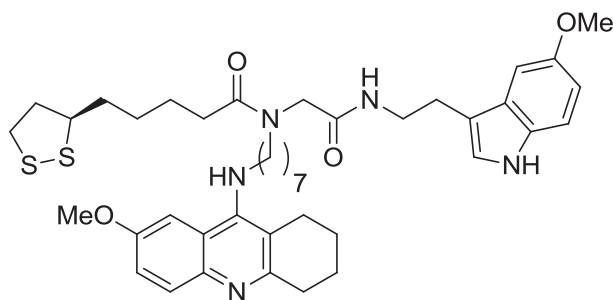
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.67 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.00-6.95 (m, 2H), 6.67 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.95-3.91 (m, 5H), 3.75 (m, 5H), 3.52-3.42 (m, 3H), 3.28-3.21 (m, 2H), 3.10-2.98 (m, 3H), 2.93-2.83 (m, 3H), 2.66 (m, 2H), 2.40-2.32 (m, 2H), 2.21-2.16 (m, 2H), 1.87-1.75 (m, 6H), 1.63-1.27 (m, 12H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 181.9, 176.1, 175.8, 171.3, 170.8, 158.4, 156.2, 156.0, 155.0, 152.1, 151.9, 136.7, 136.4, 133.4, 129.3, 129.2, 124.7, 124.5 (2C), 123.7, 123.4, 119.6, 119.4, 114.1, 113.9, 113.1, 112.9, 112.6, 104.8, 101.6, 101.5, 57.9, 57.8, 56.6, 56.5, 52.1, 50.6, 41.4, 39.4, 38.6, 36.0, 35.9, 33.9, 33.6, 32.1, 30.5, 30.4, 30.2, 30.1, 30.0, 29.7, 28.4, 27.7, 27.6, 27.5, 27.4, 26.4, 26.3, 26.1, 25.8, 25.7, 23.5 (2C), 22.4, 22.3.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3264, 2931, 2859, 1625, 1584, 1519, 1487, 1358, 1232, 1214.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>, 746.3768, found: 746.3748.

**(*R*)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-*N*-(7-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)heptyl)-*N*-(2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl) pentanamide **C7****



**C7**

C<sub>42</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
760,06 g.mol<sup>-1</sup>

*N*<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)heptane-1,7-diamine **3g** (226 mg, 0.68 mmol), formaldehyde (20 mg, 0.68 mmol), lipoic acid (140 mg, 0.68 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (136 mg, 0.68 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **C7** as an yellow foam.

**Yield:** 49%

*R<sub>f</sub>* = 0.37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

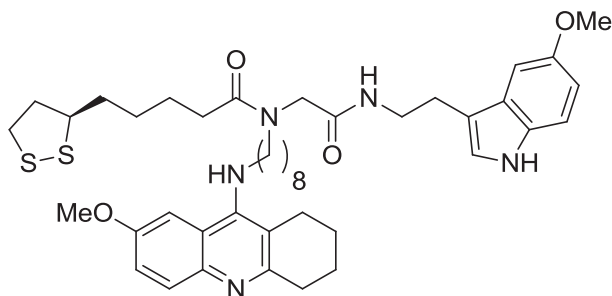
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.69 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.00-6.96 (m, 2H), 6.66 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.95-3.91 (m, 5H), 3.75 (m, 5H), 3.51-3.45 (m, 3H), 3.26-3.20 (m, 2H), 3.08-3.00 (m, 3H), 2.94-2.84 (m, 3H), 2.66 (m, 2H), 2.42-2.34 (m, 2H), 2.21-2.17 (m, 2H), 1.88-1.75 (m, 6H), 1.63-1.27 (m, 14H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 176.1, 175.8, 171.3, 170.8, 158.5, 156.5 (2C), 155.0, 151.6, 151.5, 136.0, 135.9, 133.4, 129.3, 129.2, 125.0, 124.9, 124.5, 124.4, 123.1, 123.0, 119.3, 119.2, 113.7, 113.6, 113.1, 112.9, 112.6, 104.8, 101.5, 101.4, 57.8 (2C), 56.6, 56.5, 52.1, 50.6 (2C), 41.4, 39.5, 38.4, 36.0, 35.9, 33.9, 33.6, 32.1, 30.5, 30.2, 30.1, 30.0, 29.6, 28.4, 27.9, 27.8 (2C), 27.3, 26.4, 26.3, 26.1, 25.7 (2C), 23.4, 22.3.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub> : 2927, 2854, 1649, 1623, 1554, 1483, 1450, 1392, 1356, 121.

**HRMS ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> *m/z*: 760.3925, found: 760.3902.

**(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(8-((7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)octyl)-N-(2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl) pentanamide C8**



**C8**

C<sub>43</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>  
774,09 g.mol<sup>-1</sup>

N<sup>1</sup>-(7-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine **3h** (198 mg, 0.56 mmol), formaldehyde (18 mg, 0.56 mmol), lipoic acid (115 mg, 0.56 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1H-indole **5** (112 mg, 0.56 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) according to the general procedure for the U-4CR. Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **C8** as a yellow foam.

**Yield:** 41%

**R<sub>f</sub>** = 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.10-6.94 (m, 2H), 6.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.97-3.92 (m, 5H), 3.85-3.78 (m, 2H), 3.74 (m, 3H), 3.50-3.42 (m, 3H), 3.23 (m, 2H), 3.11-2.99 (m, 3H), 2.93-2.82 (m, 3H), 2.64 (m, 2H), 2.42-2.32 (m, 2H), 2.27-2.15 (m, 2H), 1.87-1.74 (m, 6H), 1.62-1.26 (m, 16H).

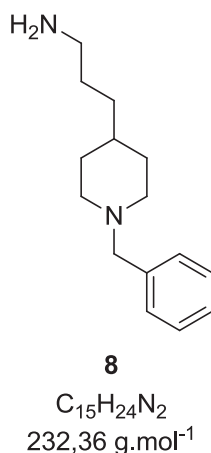
**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 176.0, 175.8, 171.3, 170.8, 158.5, 157.0, 154.9, 150.6, 134.7, 133.3, 129.2, 125.3, 124.4, 121.9, 118.6, 113.0, 112.9, 112.5, 105.1 (2C), 101.4 (2C), 57.8, 56.7, 56.5, 52.0, 50.6, 50.5, 41.4, 39.5, 33.9, 33.6, 32.2, 30.4, 30.2, 30.1 (2C), 29.6, 29.4, 28.4, 27.8, 27.7, 26.4, 26.3, 26.2, 25.6, 23.3, 22.0.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3230, 2928, 2853, 1619, 1584, 1518, 1483, 1450, 1353, 1241, 1215.

**HRMS ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>60</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>: 774.4081, found: 774.4065.

**D series**

**Precursor 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine 8.**



A solution of 1-benzyl-4-(3-chloropropyl)piperidine (1.58 g, 1.5 mmol) in 10 mL of 7N ammonia in methanol (excess) was heated at 150 °C in a Paar apparatus for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was purified by flash column chromatography  $CH_2Cl_2$ /MeOH/aqueous 30%  $NH_3$  (9:1:0.1) to afford 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine **8** as a brownish oil.

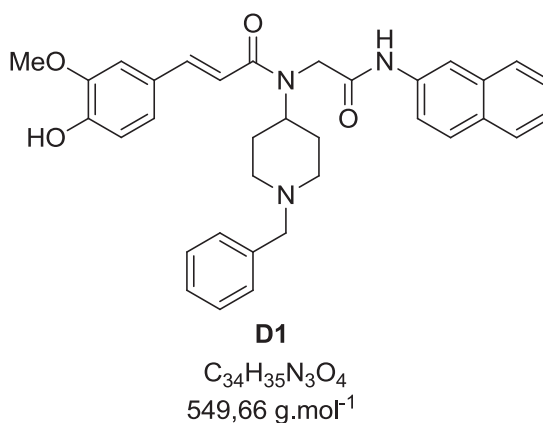
**Yield:** 39%

$R_f = 0.20$  ( $CH_2Cl_2$ /MeOH/aqueous 30%  $NH_3$  9:1:0.1)

**NMR  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta = 7.31$ -7.24 (m, 5H), 3.48 (s, 2H), 2.87 (d,  $J = 10.9$  Hz, 2H), 2.66 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.91 (t,  $J = 10.9$  Hz, 2H), 1.65 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 1.46-1.38 (m, 4H), 1.26-1.23 (m, 5H).

**NMR  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta = 138.7, 129.4, 128.3, 127.0, 63.7, 54.1, 42.1, 35.8, 34.0, 32.6, 30.7$ .

**(E)-N-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(2-(naphthalen-2-ylamino)-2-oxoethyl)acrylamide D1**



Following the general procedure for the U-4CR, 1-benzylpiperidin-4-amine (333 mg, 1.75 mmol), paraformaldehyde (53 mg, 1.75 mmol), ferulic acid (340 mg, 1.75 mmol) and naphthyl isocyanide (268 mg, 1.75 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **D1** as yellow foam.

**Yield:** 28%

**R<sub>f</sub>** 0.35 (AcOEt/MeOH/9:1)

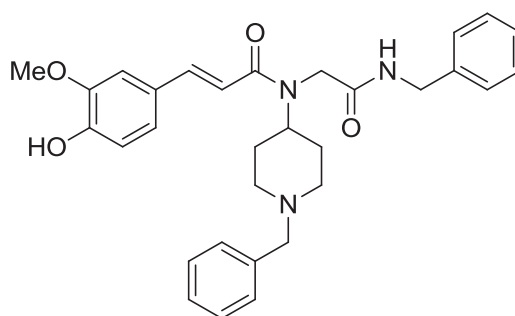
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 10.40 and 10.18 (s, 1H), 9.45 (bs, 1H), 8.34 (m, 1H), 7.90-7.80 (m, 3H), 7.61 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.50-7.38 (m, 3H), 7.30-7.21 (m, 6H), 7.14-7.08 (m, 1H), 6.90-6.75 (m, 2H), 4.53-4.45 (m, 2H), 4.21-4.13 (m, 1H), 3.85 and 3.73 (s, 3H), 3.49-3.40 (m, 2H), 2.89-2.85 (m, 2H), 2.19 (m, 1H), 2.06-2.02 (m, 1H), 1.78-1.61 (m, 4H)

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 168.6, 168.2, 166.6, 166.4, 148.5, 148.3, 147.7, 142.3, 141.7, 138.5, 136.8, 136.4, 133.4, 129.8, 129.6, 128.7, 128.5, 128.3, 128.1, 127.4, 127.3, 126.8, 126.7, 126.5, 126.4, 124.7, 124.4, 121.9, 119.9, 119.7, 166.1, 115.6, 115.5, 115.2, 115.0, 112.2, 111.5, 62.0, 55.9, 55.7, 54.3, 52.6, 52.2, 51.4, 46.1, 45.4, 30.7, 29.1.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3282, 3057, 2938, 2804, 1694, 1638, 1585, 1554, 1510, 1452, 1431.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 550.2700, found: 550.2690.

**(*E*)-*N*-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(1-benzylpiperidin-4-yl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **D2****



**D2**  
C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
513.63 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the U-4CR, 1-benzylpiperidin-4-amine (518 mg, 2.67 mmol), paraformaldehyde (80 mg, 2.67 mmol), ferulic acid (518 mg, 2.67 mmol) and benzyl isocyanide (325 μL, 2.67 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). After 24 h, a solid precipitated, and it was collected by suction filtration and washed with methanol (10 mL) and *n*-hexane (2x20 mL) to afford DFAH **D2** as an off-white solid.

**Yield:** 61%

**R<sub>f</sub>** = 0.10 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/9:1)

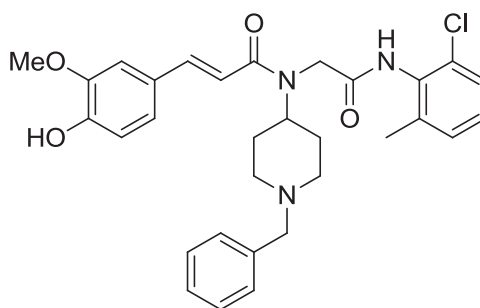
**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$ : 3277, 2953, 1656, 1639, 1603, 1581, 1511.

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$  = 9.44 (s, 1H), 8.55 and 8.25 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.46-7.18 (m, 12H), 7.05-7.00 (m, 1H), 6.82-6.71 (m, 2H), 4.43-4.27 (m, 3H), 4.17 (s, 1H), 4.11-3.98 (m, 1H), 3.83 and 3.76 (s, 3H), 3.47-3.45 (m, 2H), 2.85-2.81 (m, 2H), 2.14 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 1.99 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 1.68-1.53 (m, 4H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$  = 169.3, 166.4, 148.3, 147.7, 141.5, 138.5, 128.6, 128.1, 127.1, 126.8, 126.6, 121.7, 116.1, 115.5, 111.7, 61.9, 55.7, 52.6, 52.1, 51.4, 45.5, 42.2, 42.0, 28.9.

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 514.2700, found: 514.2676.

**(*E*)-*N*-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-*N*-(2-((2-chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **D3****



**D3**

C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
548,07 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the U-4CR, 1-benzylpiperidin-4-amine (333 mg, 1.75 mmol), paraformaldehyde (53 mg, 1.75 mmol), ferulic acid (340 mg, 1.75 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (265 mg, 1.75 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **D3** (456 mg, 45%) as yellow foam.

**Yield:** 45%

**R<sub>f</sub>** = 0.40 (AcOEt/MeOH/9:1)

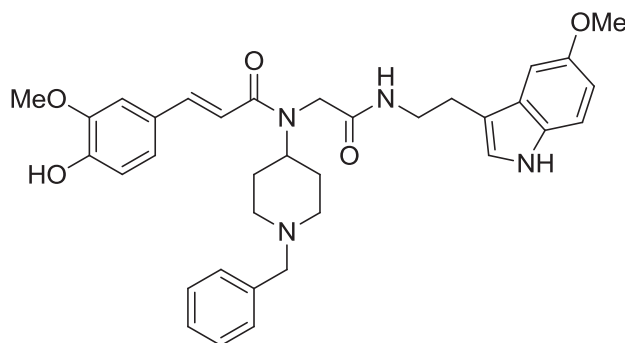
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$  = 9.77 (s, 1H), 9.50 (bs, 1H), 7.50-7.41 (m, 1H), 7.33-7.16 (m, 9H), 7.10-7.03 (m, 1H), 6.83-6.77 (m, 2H), 4.47-4.39 (m, 2H), 4.17-4.10 (m, 1H), 3.83 and 3.77 (m, 3H), 3.48-3.39 (m, 2H), 2.89-2.86 (m, 2H), 2.20-2.18 (m, 4H), 2.06-1.99 (m, 1H), 1.78-1.64 (m, 4H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$  = 168.2, 167.9, 166.6, 166.5, 148.4, 147.7, 142.3, 141.6, 138.6, 138.2, 133.7, 133.4, 131.7, 129.0, 128.9, 128.7, 128.1, 128.0, 127.7, 126.9, 126.7, 122.1, 121.8, 116.1, 115.1, 115.5, 115.1, 112.3, 111.0, 62.0, 55.9, 55.6, 54.2, 52.6, 52.1, 51.3, 45.4, 44.6, 30.5, 29.0, 18.3.

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu_{\text{max}}$ : 3196, 2940, 2803, 1682, 1642, 1584, 1511, 1452, 1452, 1430.

HRMS ESI-TOF  $[M+H]^+$   $m/z$   $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{ClN}_3\text{O}_4$ : 548.2311, found: 548.2308.

**(E)-N-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(2-((2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)acrylamide D4**



**D4**

$\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_5$   
596,72  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure for the U-4CR, 1-benzylpiperidin-4-amine (333 mg, 1.75 mmol), paraformaldehyde (53 mg, 1.75 mmol), ferulic acid (340 mg, 1.75 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1H-indole **5** (268 mg, 1.75 mmol) were reacted in MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **D4** as yellow foam.

**Yield:** 28%

**$R_f$**  0.35 (AcOEt/MeOH/9:1)

**NMR  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta$  = 10.65 (s, 1H), 8.19 and 7.80 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 7.48-7.39 (m, 1H), 7.35-7.20 (m, 7H), 7.12 (s, 1H), 7.06-6.99 (m, 2H), 6.84-6.71 (m, 3H), 4.40-4.34 (m, 1H), 4.09-3.99 (m, 1H), 3.92 (bs, 1H), 3.84-3.74 (m, 6H), 3.45-3.34 (m, 3H), 2.82-2.80 (m, 4H), 2.15-2.08 (m, 1H), 2.02-1.98 (m, 1H), 1.92 (s, 2H), 1.64-1.54 (m, 4H).

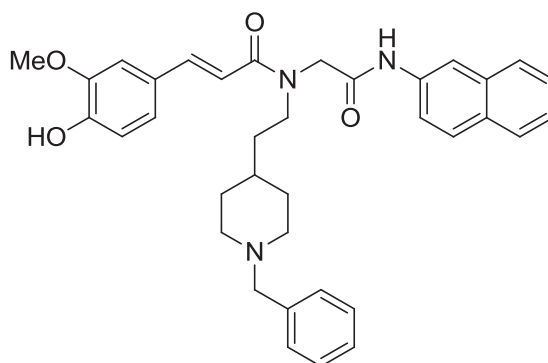
**NMR  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta$  = 169.2, 169.0, 166.5, 153.0, 148.5, 148.3, 147.7, 142.2, 141.5, 138.5, 131.4, 128.8, 128.1, 127.5, 126.9, 126.8, 123.3, 121.8, 116.2, 115.6, 115.1, 112.2, 112.0, 111.6, 111.3, 111.0, 100.1, 62.0, 55.9, 55.7, 55.3, 54.2, 52.6, 52.1, 51.5, 45.7, 44.8, 30.3, 28.9, 25.3, 21.1.

IR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu_{\text{max}}$ : 3282, 2937, 1641, 1582, 1513, 1485, 1453.

HRMS ESI-TOF  $[M+H]^+$   $m/z$   $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_5$ : 597.3071, found: 597.3049.



**(*E*)-*N*-(2-(1-Benzylpiperidin-4-yl)ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(2-(naphthalen-2-ylamino)-2-oxoethyl)acrylamide **D5****



**D5**

C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
MW: 577,71

Following the general procedure for the U-4CR, 2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethan-1-amine (218 mg, 1 mmol), paraformaldehyde (30 mg, 1 mmol), ferulic acid (194 mg, 1 mmol) and naphthyl isocyanide (153 mg, 1 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **D5** as yellow foam.

**Yield:** 17%

**R<sub>f</sub>** 0.13 (AcOEt/MeOH/9:1)

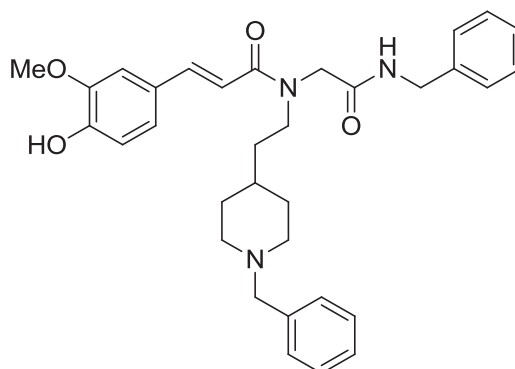
**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3277, 2964, 2925, 1699, 1640, 1603, 1583, 1558, 1511, 1449.

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 10.40 and 10.23 (s, 1H), 9.48 (bs, 1H), 8.32 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.89-7.79 (m, 3H), 7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.49-7.37 (m, 3H), 7.33-7.23 (m, 6H), 7.11 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00-6.89 (m, 1H), 6.82 and 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.25 (s, 1H), 3.78 and 3.75 (s, 3H), 3.64 (m, 1H), 3.49-3.44 (m, 1H), 3.40 (s, 2H), 2.75 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 1.88 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 1.74-1.57 (m, 3H), 1.48-1.46 (m, 1H), 1.27-1.10 (m, 3H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 167.9, 167.8, 166.5, 166.1, 148.5, 148.4, 147.8, 147.7, 142.0, 141.7, 138.7, 136.6, 136.3, 133.4, 129.8, 129.7, 128.7, 128.5, 128.4, 128.1, 127.4, 127.2, 126.7, 126.6, 126.5, 126.4, 124.7, 124.5, 122.2, 122.1, 119.9, 119.8, 115.6, 115.3, 115.1, 114.6, 111.4, 111.1, 62.5, 55.7, 55.6, 53.2, 50.3, 46.7, 44.7, 35.8, 33.9, 33.2, 32.9, 31.9.

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 578.3013, found : 578.2993.

**(*E*)-*N*-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-*N*-(2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide **D6****



**D6**

$C_{33}H_{39}N_3O_4$   
541,68 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the U-4CR, 2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethan-1-amine (565 mg, 2.59 mmol), paraformaldehyde (78 mg, 2.59 mmol), ferulic acid (503 mg, 2.59 mmol) and benzyl isocyanide (315  $\mu$ L, 2.59 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). After 24 h, a solid has precipitated. The solid was collected by suction filtration and washed with with methanol (10 mL) and *n*-hexane (2x20 mL) to afford adduct **D6** as an off-white solid.

**Yield:** 56%

**R<sub>f</sub>** 0.13 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/9:1)

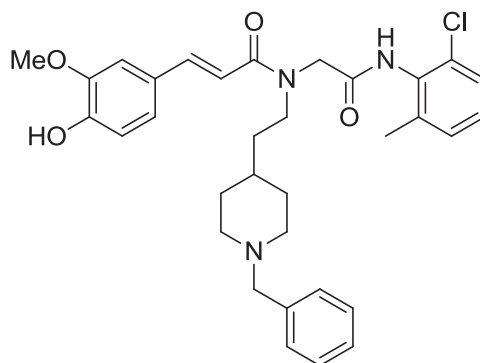
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$  = 9.44 (bs, 1H), 8.59 and 8.37 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.44-7.21 (m, 12H), 7.10 and 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.93-6.76 (m, 2H), 4.30 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.22 (m, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.77 and 3.76 (s, 3H), 3.53 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.41-3.34 (m, 3H), 2.75 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 1.86 (t, *J* = 10.7 Hz, 2H), 1.65 (t, *J* = 10.7 Hz, 2H), 1.53-1.47 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.44-1.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.29-1.11 (m, 3H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6)**  $\delta$  = 168.6, 168.5, 166.1, 165.9, 148.5, 148.3, 147.7, 141.7, 141.6, 139.4, 139.2, 138.6, 128.6, 128.1, 128.0, 127.1, 126.7, 122.0, 121.9, 115.5, 115.2, 114.8, 111.6, 111.1, 62.4, 55.7, 55.5, 53.1, 50.1, 49.2, 46.3 (2C), 44.7, 42.2, 42.0, 35.5, 33.7, 33.1, 32.8, 31.9, 31.8.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$  : 3266, 3064, 2937, 2816, 1643, 1606, 1593, 1543, 1511, 1461.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 542.3013, found : 542.2999.

**(E)-N-(2-(1-Benzylpiperidin-4-yl)ethyl)-N-(2-((2-chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide (D7)**



**D7**

$C_{33}H_{38}ClN_3O_4$   
576,13 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the U-4CR, 2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethan-1-amine (546 mg, 2.5 mmol), paraformaldehyde (75 mg, 2.5 mmol), ferulic acid (485 mg, 2.5 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (379 mg, 2.5 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). After 24 h, a solid has precipitated. The solid was collected by suction filtration and washed with methanol (10 mL) and *n*-hexane (2x20 mL) to afford adduct **D7** as an off-white solid.

**Yield:** 27%

**R<sub>f</sub>** 0.17 (AcOEt/MeOH/9:1)

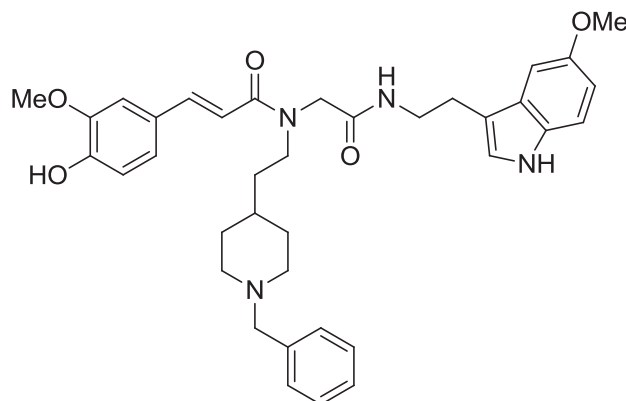
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 9.78 and 9.58 (s, 1H), 9.46 (bs, 1H), 7.46-7.17 (m, 10H), 7.11 and 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H) 6.96-6.87 (m, 1H), 6.81-6.77 (m, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.22 (s, 1H), 3.80 and 3.77 (s, 3H), 3.60 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.49-3.41 (m, 3H), 2.77-2.74 (m, 2H), 2.20 and 2.17 (s, 3H), 1.88 (t, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.68 (t, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.57-1.46 (m, 2H), 1.32-1.14 (m, 3H)

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 167.6, 167.5, 166.3, 166.1, 148.5, 148.4, 147.8, 141.9, 141.6, 138.7, 138.4, 138.2, 133.6, 133.4, 131.7, 129.0, 128.9, 128.7, 128.1, 127.9, 127.8, 126.9, 126.8, 126.7, 126.6 (2C), 122.1, 115.6, 115.5, 115.2, 114.7, 111.1, 62.5, 55.6 (2C), 53.2, 50.0, 49.1, 46.3, 35.6, 33.2, 32.9, 32.0, 31.9, 18.3 (2C).

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub> : 3202, 2925, 1676, 1651, 1596, 1579, 1513, 1467, 1444.

**HRMS ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> *m/z* : 576.2624, found : 576.2624.

**(*E*)-*N*-(2-(1-Benzylpiperidin-4-yl)ethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)acrylamide **D8****



**D8**

C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>  
624,77 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the U-4CR, 2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethan-1-amine (327 mg, 1.5 mmol), paraformaldehyde (45 mg, 1.5 mmol), ferulic acid (291 mg, 1.5 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (300 mg, 1.5 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (8:2) afforded adduct **D8** (276 mg, 29%) as yellow foam.

**Yield:** 29%

***R*<sub>f</sub>** 0.17 (AcOEt/MeOH/8:2)

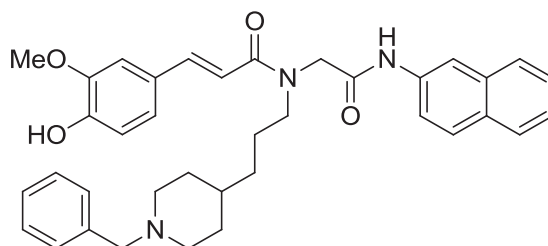
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 10.66 (s, 1H), 8.21 and 7.94 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.43 and 7.38 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.33-7.21 (m, 7H), 7.12-6.98 (m, 3H), 6.92-6.76 (m, 2H), 6.71 (dd, *J* = 8.5 Hz, 1.9 Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.80-3.74 (m, 6H), 3.47-3.34 (m, 5H), 2.82-2.73 (m, 4H), 1.91-1.84 (m, 4H), 1.64 (t, *J* = 11.4 Hz, 2H), 1.47-1.39 (m, 2H), 1.22-1.16 (m, 3H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 168.5, 168.3, 166.2, 165.9, 153.0, 148.5, 148.4, 147.8, 141.8, 141.6, 138.6, 131.4, 128.8, 128.1, 127.5, 126.8, 126.6, 123.3, 122.1, 115.6, 115.3, 114.8, 112.0, 111.5, 111.4, 111.3, 111.0, 100.1, 62.5, 55.7, 55.6, 55.3, 53.2, 50.2, 49.2, 46.2, 44.5, 35.5, 33.7, 33.1, 32.8, 31.8, 31.7, 25.2, 21.1.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3282, 2929, 1643, 1582, 1513, 1484, 1450.

**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>37</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [*M*+*H*<sup>+</sup>] *m/z*: 625.3384, found: 625.3371.

**(E)-N-(3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)propyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-(2-(naphthalen-2-ylamino)-2-oxoethyl)acrylamide D9**



**D9**

$C_{37}H_{41}N_3O_4$   
591,74 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the U-4CR, 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine (100 mg, 0.43 mmol), paraformaldehyde (13 mg, 0.43 mmol), ferulic acid (83 mg, 0.43 mmol) and naphthyl isocyanide (66 mg, 0.43 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **D9** as yellow foam.

**Yield:** 34%

**R<sub>f</sub>** 0.09 (AcOEt/MeOH/9:1)

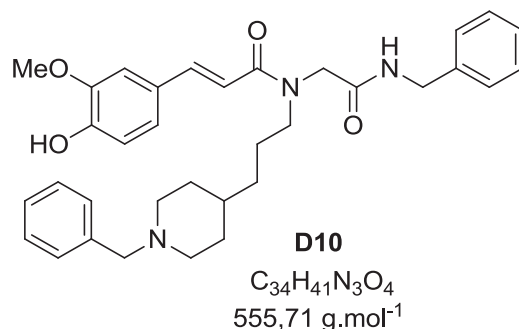
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 8.18 (s, 1H), 7.74-7.67 (m, 3H), 7.54-7.50 (m, 2H), 7.40-7.33 (m, 2H), 7.30-7.21 (m, 5H), 7.13-6.98 (m, 2H), 6.90 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 6.81-6.69 (m, 1H), 4.42 and 4.28 (s, 2H), 3.83 and 3.67 (s, 3H), 3.59 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.49-3.40 (m, 3H), 2.77 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 1.87 (t, *J* = 10.7 Hz, 2H), 1.65-1.57 (m, 4H), 1.24-1.16 (m, 5H).

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 170.3, 170.1, 169.9, 149.5, 149.4, 145.1, 144.9, 138.2, 137.3, 137.1, 135.4, 132.3, 132.2, 131.1, 129.9, 129.7, 129.4, 128.7, 128.6, 128.4, 127.7, 127.6, 126.3, 126.1, 123.9, 123.6, 121.3, 121.2, 118.0, 117.9, 116.7, 116.6, 115.7, 115.0, 112.2, 111.7, 64.4, 56.6, 56.4, 54.8, 52.1, 51.1, 36.4, 34.8, 34.4, 32.9, 27.5, 26.1.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3270, 3057, 2928, 1689, 1639, 1585, 1555, 1509, 1450, 1431.

**HRMS ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 592.3170, found: 592.3160.

**(E)-N-(2-(Benzylamino)-2-oxoethyl)-N-(3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide D10**



Following the general procedure for the U-4CR, 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine (100 mg, 0.43 mmol), paraformaldehyde (13 mg, 0.43 mmol), ferulic acid (83 mg, 0.43 mmol) and benzyl isocyanide (52  $\mu$ L, 0.43 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **D10** as yellow foam.

**Yield:** 40%

**R<sub>f</sub>** 0.16 (AcOEt/MeOH/9:1)

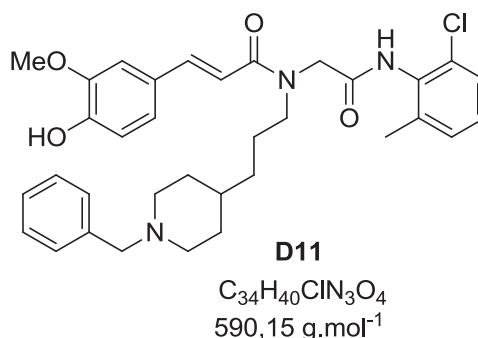
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 7.48 and 7.43 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 7.24-7.09 (m, 11H), 7.01 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.93-6.81 (m, 1H), 6.75-6.63 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 4.24-3.94 (m, 2H), 3.79-3.69 (m, 3H), 3.50-3.31 (m, 4H), 2.80 (t,  $J$  = 12.0 Hz, 2H), 2.00-1.84 (m, 2H), 1.57-1.48 (m, 4H), 1.15 (m, 5H).

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$  = 171.4, 171.2, 169.9, 150.4, 149.5, 144.9, 140.0, 139.9, 137.8, 137.7, 135.8, 135.7, 131.2, 129.7, 129.5, 128.6, 128.3, 124.2, 123.8, 123.6, 121.3, 120.7, 116.7, 116.3, 115.4, 115.1, 113.2, 113.1, 112.2, 112.1, 64.2, 56.6, 54.7, 52.2, 51.7, 51.3, 50.9, 44.3, 44.2, 36.5, 36.3, 34.7, 34.3, 32.8, 32.6, 27.4, 26.7, 26.0.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)**  $\nu_{\max}$ : 3283, 2924, 1643, 1585, 1513, 1453, 1427.

**HRMS ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$**  C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 556.3170, found: 556.3154.

**(E)-N-(3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)propyl)-N-(2-((2-chloro-6-methylphenyl)amino)-2-oxoethyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide D11**



Following the general procedure for the U-4CR, 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine (100 mg, 0.43 mmol), paraformaldehyde (13 mg, 0.43 mmol), ferulic acid (83 mg, 0.43 mmol) and 2-chloro-6-methylphenyl isocyanide (65 mg, 0.43 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded DFAH **D11** (58 mg, 23%) as yellow foam.

**Yield:** 23%

**R<sub>f</sub>** = 0.11 (AcOEt/MeOH/9:1)

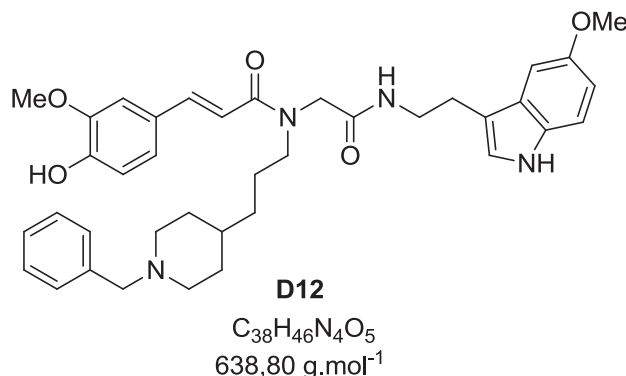
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.50 (dd, *J* = 15.5 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.26-7.22 (m, 6H), 7.13-7.11 (m, 3H), 7.06-6.99 (m, 1H), 6.89 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.80-6.74 (m, 1H), 4.44 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 3.83 and 3.81 (s, 3H), 3.59 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.51 (m, 3H), 2.83 (t, *J* = 10.3 Hz, 2H), 2.23 and 2.17 (s, 3H), 2.00-1.88 (m, 2H), 1.65-1.62 (m, 4H), 1.23-1.17 (m, 5H)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 170.5, 170.3, 170.1, 170.0, 150.5, 149.5, 145.0, 140.1, 139.8, 138.1, 134.2, 134.1, 133.7, 131.1, 130.4, 130.3, 129.8, 129.5, 129.4, 128.6, 128.3, 124.0, 123.6, 116.7, 116.6, 115.4, 115.1, 112.2, 111.8, 64.4, 56.6, 54.8, 52.0, 51.1, 50.9, 50.0, 36.7, 36.4, 34.8, 34.4, 32.9, 32.8, 27.4, 26.1, 19.0.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3200, 2922, 1678, 1642, 1584, 1512, 1452.

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 590.2780, found: 590.2767.

**(*E*)-*N*-(3-(1-Benzylpiperidin-4-yl)propyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-*N*-(2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl)acrylamide **D12****



Following the general procedure for the U-4CR, 3-(1-benzylpiperidin-4-yl)propan-1-amine (100 mg, 0.43 mmol), paraformaldehyde (13 mg, 0.43 mmol), ferulic acid (83 mg, 0.43 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (86 mg, 0.43 mmol) were reacted in MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **D12** as yellow foam.

**Yield:** 25%

***R*<sub>f</sub>** 0.07 (AcOEt/MeOH/9:1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 7.46 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.26-7.22 (m, 5H), 7.18-7.13 (m, 2H), 7.10-6.99 (m, 3H), 6.81-6.65 (m, 3H), 4.12 and 4.01 (s, 2H), 3.85 and 3.80 (s, 3H), 3.77 and 3.75 (s, 3H), 3.53-3.43 (m, 5H), 3.34 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 10.6 Hz, 2H), 1.90 (t, *J* = 10.6 Hz, 2H), 1.60-1.50 (m, 4H), 1.25-1.16 (m, 5H).

**NMR <sup>13</sup>C (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ = 171.4, 171.2, 170.1, 169.9, 155.1, 150.4, 150.3, 149.5, 145.0, 138.1, 133.5, 131.1, 129.4, 128.6, 128.5, 124.5, 124.3, 123.8, 123.6, 116.7, 116.6, 115.4, 115.0, 113.1, 113.0, 112.7, 112.3, 111.9, 101.4, 64.4, 56.7, 56.6, 56.4, 54.8, 52.3, 51.2, 50.5, 41.5, 36.6, 36.3, 34.8, 34.3, 32.9, 32.7, 27.2, 26.4, 26.2, 25.8.

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)** ν<sub>max</sub>: 3285, 2927, 1642, 1584, 1513, 1485, 1451.

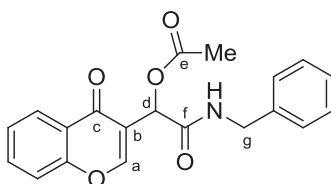
**HRMS ESI-TOF [*M*+*H*]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 639.3541, found: 639.3533.



**General procedure for the Passerini adducts E1-E9:**

A solution of the corresponding aldehyde (1 equiv), acetic acid (1 equiv) and the corresponding isocyanide (1 equiv) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 M) was stirred for 24 h at room temperature. The crude product was either purified by flash column chromatography or filtrated to afford the corresponding Passerini adduct.

**2-(benzylamino)-2-oxo-1-(4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)ethyl acetate **E1****



**E1**

C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>  
MW: 351,35 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the P-3CR, 3-formylchromone (0.5 g, 2.87 mmol), acetic acid (164 µL, 2.87 mmol) and benzyl isocyanide (349 µL, 2.87 mmol) were reacted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL). Flash column chromatography cyclohexane/AcOEt (1:1) afforded adduct **E1** as an off-white solid.

**Yield:** 74%

**R<sub>f</sub>** : 0.34 (Cyclohexane/AcOEt 1:1)

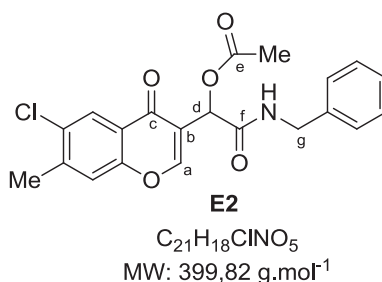
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 8.24 (s, 1H, H-a), 8.19 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.70 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.49 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.43 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.32-7.21 (m, 6H, Ar+NH), 6.15 (s, 1H, H-d), 4.58-4.51 (dd, *J* = 15.0 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-g), 4.45-4.38 (dd, *J* = 15.0 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-g), 2.20 (s, 3H, Me).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 176.5 (C-c), 169.7 (C-e), 167.6 (C-f), 156.3 (C-a), 155.7 (Ar), 137.9 (Ar), 134.4 (Ar), 128.7 (Ar), 127.6 (Ar), 127.5 (Ar), 125.9 (Ar), 125.8 (Ar), 123.9 (Ar), 119.5 (Ar), 118.4 (Ar), 68.7 (C-d), 43.6 (C-g), 21.0 (Me).

**IR (ATR, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3315, 3068, 2933, 1741, 1642, 1609, 1530, 1465.

**HRMS ESI-TOF [M+Na]<sup>+</sup> *m/z*** C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>5</sub>, 374.0999, found: 374.1002.

**2-(benzylamino)-1-(6-chloro-7-methyl-4-oxo-4H-chromen-3-yl)-2-oxoethyl acetate **E2****



Following the general procedure for the P-3CR, 6-chloro-3-formyl-7-methylchromone (300 mg, 1.3 mmol), acetic acid (84  $\mu$ L, 1.3 mmol) and benzyl isocyanide (164  $\mu$ L, 1.3 mmol) were reacted in  $CH_2Cl_2$  (1.5 mL). After 24h, a solid has precipitated which was collected by suction filtration and washed with  $Et_2O/CH_2Cl_2$  (9:1) to afford adduct **E2** as a white solid.

**Yield** : 34%

**R<sub>f</sub>** : 0.31 (Cyclohexane/AcOEt 1:1)

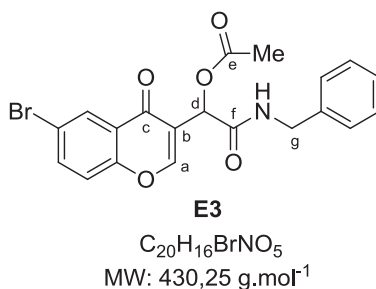
**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.20 (s, 1H, H-a), 8.14 (s, 1H, Ar), 7.39 (s, 1H, Ar), 7.34-7.25 (m, 5H, Ar), 7.14 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 6.10 (s, 1H, H-d), 4.59-4.52 (dd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-g), 4.45-4.38 (dd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-g), 2.51 (s, 3H), 2.20 (s, 3H).

**NMR <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 175.4 (C-c), 169.8 (C-e), 167.5 (C-f), 155.8 (C-a), 154.7 (Ar), 144.0 (Ar), 137.9 (Ar), 132.7 (Ar), 128.9 (Ar), 127.8 (Ar), 127.6 (Ar), 125.7 (Ar), 125.6 (Ar), 123.0 (Ar), 122.6 (Ar), 120.3 (Ar), 119.5 (Ar), 68.8 (C-d), 66.2 (Me), 43.7, 21.1 (Me).

**IR (ATR,  $\nu_{max}$ , cm<sup>-1</sup>)**: 3253, 3069, 2927, 1742, 1645, 1538, 1455.

**HRMS ESI-TOF [*M*+Na]<sup>+</sup> *m/z* anal. calcd. for  $C_{21}H_{18}ClNNaO_5$ : 422.0766, found: 422.0760.**

**2-(benzylamino)-1-(6-bromo-4-oxo-4H-chromen-3-yl)-2-oxoethyl acetate **E3****



Following the general procedure for the P-3CR, 6-bromo-3-formylchromone (0.5 g, 1.98 mmol), acetic acid (113  $\mu$ L, 1.98 mmol) and benzyl isocyanide (240  $\mu$ L, 1.98 mmol) were reacted in  $CH_2Cl_2$  (2 mL). Flash column chromatography cyclohexane/AcOEt (7:3) afforded adduct **E3** as a white solid.

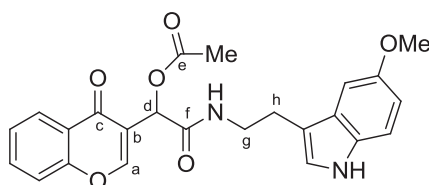
**Yield :** 69%

***R<sub>f</sub>*** : 0.56 (Cyclohexane/AcOEt 7:3)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 8.33 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, Ar), 8.23 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-a), 7.80 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.3 Hz, 1H, Ar), 7.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.34-7.26 (m, 5H, Ar), 7.06 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 6.09 (s, 1H, H-d), 4.60-4.53 (dd, *J* = 15.1 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-g), 4.45-4.38 (dd, *J* = 15.1 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-g), 2.21 (s, 3H, Me).

**HRMS ESI-TOF [*M*+Na]<sup>+</sup> *m/z*** anal. calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>BrNNaO<sub>5</sub>: 452.0104, found: 452.0091.

**2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxo-1-(4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)ethyl acetate **E4****



**E4**

C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>  
MW: 434,44 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the P-3CR, 3-formylchromone (85 mg, 0.49 mmol), acetic acid (28 μL, 0.49 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (100 mg, 0.49 mmol) were reacted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL). Flash column chromatography cyclohexane/AcOEt (7:3) afforded adduct **E4** as yellow foam.

**Yield :** 60%

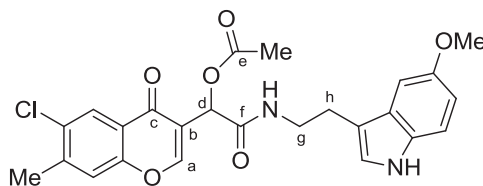
***R<sub>f</sub>*** : 0.33 (Cyclohexane/AcOEt 7:3)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 8.31 (bs, 1H, NH<sub>indole</sub>), 8.15 (s, 1H, H-a), 8.12 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 7.00-6.95 (m, 3H, Ar+NH<sub>amide</sub>), 6.76 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar), 6.05 (s, 1H, H-d), 3.82 (s, 3H, Me<sub>indole</sub>), 3.60 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-g), 2.93 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-h), 2.09 (s, 3H, Me<sub>acetylyl</sub>).

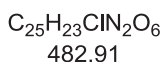
**IR (ATR, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3325, 2938, 1743, 1641, 1465.

**HRMS ESI-TOF [*M*+Na]<sup>+</sup> *m/z*** anal. calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>: 457.1370, found: 457.1355.

**1-(6-chloro-7-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)-2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl acetate **E5****



**E5**



Following the general procedure for the P-3CR, 6-chloro-3-formyl-7-methylchromone (108 mg, 0.49 mmol), acetic acid (28  $\mu$ L, 0.49 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (100 mg, 0.49 mmol) were reacted in  $CH_2Cl_2$  (0.5 mL). Flash column chromatography cyclohexane/AcOEt (1:1) afforded adduct **E5** as yellow foam.

**Yield** : 48%

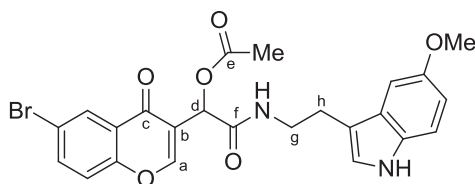
**$R_f$**  : 0.13 (Cyclohexane/AcOEt 1:1)

**NMR  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  = 8.25 (bs, 1H,  $NH_{indole}$ ), 8.09 (s, 1H, H-a), 7.99 (s, 1H, Ar), 7.30 (s, 1H, Ar), 7.13 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.01 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Ar), 6.96-6.92 (m, 2H, Ar+ $NH_{amide}$ ), 6.74 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Ar), 6.01 (s, 1H, H-d), 3.81 (s, 3H,  $Me_{indole}$ ), 3.61 (qd,  $J$  = 6.3 Hz,  $J$  = 2.8 Hz, 2H, H-g), 2.93 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, H-h), 2.48 (s, 3H), 2.09 (s, 3H,  $Me_{acetylate}$ ).

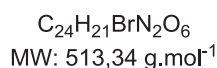
**IR (ATR,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ):** 3330, 3071, 2936, 1742, 1646, 1454, 1421.

**HRMS ESI-TOF [ $M+Na$ ] $^+$   $m/z$  anal. calcd. for  $C_{25}H_{23}ClN_2NaO_6$ :** 505.1137, found 505.1120.

**1-(6-bromo-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)-2-((2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl)amino)-2-oxoethyl acetate **E6****



**E6**



Following the general procedure for the P-3CR, 6-bromo-3-formylchromone (124 mg, 0.49 mmol), acetic acid (28  $\mu$ L, 0.49 mmol) and 3-(2-isocyanoethyl)-5-methoxy-1*H*-indole **5** (100 mg, 0.49 mmol) were reacted in  $CH_2Cl_2$  (0.5 mL). Flash column chromatography cyclohexane/AcOEt (7:3) afforded adduct **E6** as yellow foam.

**Yield :** 56%

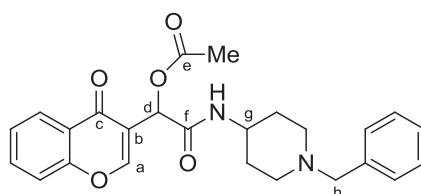
***R<sub>f</sub>*** : 0.43 (Cyclohexane/AcOEt 7:3)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 8.33 (bs, 1H, NH<sub>indole</sub>), 8.16 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar), 8.12 (s, 1H, H-a), 7.73 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, Ar), 7.31 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, Ar), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.01-6.91 (m, 3H, Ar+NH<sub>amide</sub>), 6.73 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, Ar), 6.00 (s, 1H, H-d), 3.81 (s, 3H, Me<sub>indole</sub>), 3.61 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-g), 2.93 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-h), 2.09 (s, 3H, Me<sub>acetylle</sub>).

**IR (ATR, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3330, 3083, 2937, 1742, 1644, 1460.

**HRMS ESI-TOF [*M*+Na]<sup>+</sup> *m/z* anal. calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>BrN<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>:** 535.0475, found 535.0457.

**2-((1-benzylpiperidin-4-yl)amino)-2-oxo-1-(4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)ethyl acetate **E7****



**E7**

C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
MW: 434,48 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the P-3CR, 3-formylchromone (102 mg, 0.59 mmol), acetic acid (34 μL, 0.59 mmol) and 1-benzyl-4-isocyanopiperidine **7a** (120 mg, 0.59 mmol) were reacted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.6 mL). Flash column chromatography AcOEt/MeOH (9:1) afforded adduct **E7** as orange foam.

**Yield:** 67%

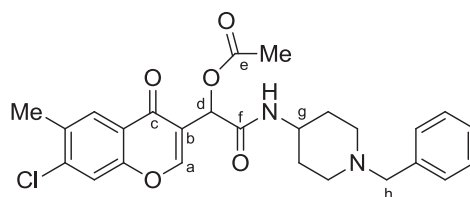
***R<sub>f</sub>*** : 0.36 (AcOEt/MeOH 9:1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 8.19-8.16 (m, 2H, Ar+H-a), 7.67 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.47-7.38 (m, 2H, Ar), 7.26 (m, 5H, Ar), 6.9 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 6.04 (s, 1H, H-d), 3.79-3.76 (m, 1H, H-g), 3.48 (s, 2H, H-h), 2.82 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidinyll</sub>), 2.72 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidinyll</sub>), 2.17-2.07 (m, 4H, CH<sub>piperidinyll</sub>+Me), 2.02-1.95 (m, 1H, CH<sub>piperidinyll</sub>), 1.78 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH<sub>piperidinyll</sub>), 1.63 (q, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH<sub>piperidinyll</sub>), 1.46 (q, *J* = 12.4 Hz, 1H, CH<sub>piperidinyll</sub>).

**IR (ATR, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3311, 3066, 2940, 2803, 1744, 1644, 1609, 1465.

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z* anal. calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>:** 435.1914, found 435.1912.

**2-((1-benzylpiperidin-4-yl)amino)-1-(7-chloro-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-3-yl)-2-oxoethyl acetate **E8****



**E8**

$C_{26}H_{27}ClN_2O_5$   
MW: 482,96 g.mol<sup>-1</sup>

Following the general procedure for the P-3CR, 6-chloro-3-formyl-7-methylchromone (131 mg, 0.59 mmol), acetic acid (34  $\mu$ L, 0.59 mmol) and 1-benzyl-4-isocyanopiperidine **7a** (120 mg, 0.59 mmol) were reacted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.6 mL). Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **E8** as orange foam.

**Yield** : 61%

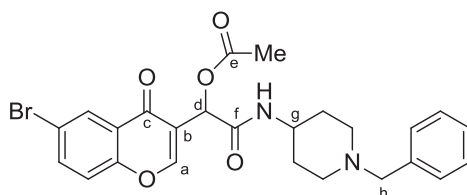
**R<sub>f</sub>** : 0.21 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.17 (s, 1H, H-a), 8.13 (s, 1H, Ar), 7.37 (s, 1H, Ar), 7.29 (m, 5H, Ar), 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.03 (s, 1H, H-a), 3.80 (m, 1H, H-g), 3.54 (s, 2H, H-h), 2.86 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>), 2.76 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>), 2.49 (s, 3H, Me<sub>chromone</sub>), 2.24-2.11 (m, 4H, CH<sub>piperidiny</sub>+Me<sub>acety</sub>), 2.05-1.98 (m, 2H, CH<sub>piperidiny</sub>), 1.81 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>), 1.66 (q, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>), 1.50 (q, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>).

**IR (ATR,  $\nu_{max}$ , cm<sup>-1</sup>):** 3315, 3064, 2803, 1744, 1650, 1421, 1220.

**HRMS ESI-TOF [*M*+H]<sup>+</sup> *m/z* anal.** cald. for C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 483.1681, found: 483.1665.

**2-((1-benzylpiperidin-4-yl)amino)-1-(6-bromo-4-oxo-4H-chromen-3-yl)-2-oxoethyl acetate **E9****



**E9**

$C_{25}H_{25}BrN_2O_5$   
MW: 513,38

Following the general procedure for the P-3CR, 6-chloro-3-formyl-7-methylchromone (149 mg, 0.59 mmol), acetic acid (34  $\mu$ L, 0.59 mmol) and 1-benzyl-4-isocyanopiperidine **7a** (120 mg, 0.59 mmol) were reacted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.6 mL). Flash column chromatography CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) afforded adduct **E9** as orange foam.

**Yield** : 58%

Partie expérimentale – Experimental part

***R<sub>f</sub>*** : 0.18 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

**NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 8.30 (s, 1H, H-a), 8.22 (s, 1H, Ar), 7.76 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, Ar), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.30 (m, 5H), 6.86 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 6.02 (s, 1H, H-d), 3.82-3.80 (m, 1H, H-g), 3.56 (s, 2H, H-h), 2.88 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>l), 2.79 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>l), 2.31-2.13 (m, 4H, CH<sub>piperidiny</sub>l+Me), 2.05-1.98 (m, 2H, CH<sub>piperidiny</sub>l), 1.82 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>l), 1.67 (q, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>l), 1.53 (q, *J* = 12.5 Hz, 1H, CH<sub>piperidiny</sub>l).

**IR (ATR, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>):** 3316, 3067, 2939, 2802, 1744, 1649, 1461, 1219.

**HRMS ESI-TOF [M-Br+2H]<sup>+</sup> *m/z* anal. cald. for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:** 435.1914, found 435.1909.

## Biological, toxicological and physico-chemical evaluations

### Cell culture

#### ***In vitro* toxicity of adducts B1-B14 in HepG2 cells**

The HepG2 cell line was kindly provided by IdiPAZ Institute for Health Research (Madrid, Spain). The cells were cultured in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 15 nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (reagents from Invitrogen, Madrid, Spain). Cultures were seeded into flasks containing supplemented medium and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Culture media were changed every 2 days. Cells were sub-cultured after partial digestion with 0.25% trypsin-EDTA. For assays, HepG2 cells were subcultured in 96-well plates at a seeding density of 1x10<sup>5</sup> cells per well. When the HepG2 cells reached 80% confluence, the medium was replaced with fresh medium containing 1–1000 µM compounds or 0.1% DMSO as a vehicle control. The cell viability was determined by MTT assay. The absorption was measured by a well plate reader at 540 nm.

#### **Effect of adducts B1-B14 on O/R and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative cell damage in SH-SY5Y cells**

Human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells were maintained in a 1:1 mixture of Nutrient Mixture F-12 and Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 15 nonessential amino acids, sodium pyruvate (1 mM), 10% heat-inactivated FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cultures were seeded into flasks containing supplemented medium and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. For assays, SH-SY5Y cells were subcultured in 96-well plates at a seeding density of 8x10<sup>4</sup> cells per well for 2 days. Cells were co-incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 µM) or oligomycin A (10 µM)/rotenone (30 µM) (O/R) for 24 h to induce oxidative stress at several concentrations of test compounds in F-12/EMEM with 1% FBS. A vehicle group containing 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) was employed in parallel for each experiment. All SH-SY5Y cells used in this study were used at a low passage number (<13). The cell viability was determined by MTT assay. The absorption was measured by a well plate reader at 540 nm.

#### **Effects of adducts B1-B14 on Aβ<sub>1-40</sub> and Aβ<sub>1-42</sub> peptides-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells**

Lyophilized Aβ<sub>1-40</sub> and Aβ<sub>1-42</sub> peptides (Abcam, MA, USA) were reconstituted in sterile water at a concentration of 2 mM and kept at 80 °C until use. Aliquots were diluted with a culture medium to achieve a final concentration of 30 µM and then incubated at 37 °C for 72 h to form aggregated amyloid. For assays, SH-SY5Y cells were sub-cultured into a 96 well plate for 24 h. Then, the cells were incubated with Aβ<sub>1-40</sub> and Aβ<sub>1-42</sub> peptides (30 µM) without or with various concentrations of the test compound for 24 h. Cell viability was determined by staining the cells with 0.5 mg/ml of MTT assay. The absorption was measured by a well plate reader at 540 nm.

#### **Measurement of cell viability**

MTT reduction was performed as described<sup>325</sup> for the HepG2 cell line. This assay is based on the ability of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase to convert the yellow water-soluble tetrazolium salt (MTT) into formazan crystals in metabolically active cells.



Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of the MTT labeling reagent, at a final concentration of 0.5 mg/ml, was added. After incubation for 2 h, in a humidified incubator at 37 °C with 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air (v/v), the supernatant was removed, the obtained purple formazan product was re-suspended in 100  $\mu\text{L}$  of Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Colorimetric determination of MTT reduction was measured in an ELISA microplate reader at 540 nm. Control cells treated with EMEM were taken as 100% viability.

## Inhibition of cholinesterases

### Inhibition of *EeAChE* and *eqBuChE* for all the compounds

Inhibitory activity assessment of the compounds on ChEs was performed following the spectrophotometric method of Ellman<sup>311</sup> using purified AChE from *Electrophorus electricus* (Type V-S, Sigma-Aldrich) or BuChE from horse serum (lyophilized powder, Sigma-Aldrich). Enzymes were first dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH= 8.0) and then aliquoted in small vials. Compounds stock solutions in DMSO (10 mM) were further diluted with DMSO to prepare nine serial dilutions of each compound. The reaction occurs in a final volume of 3 mL of a 0.1 M phosphate-buffered solution at pH= 8.0, containing 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, 2625  $\mu\text{L}$ , 0.35 mM, final concentration), *EeAChE* (29  $\mu\text{L}$ , 0.035 U/mL, final concentration) or *eqBuChE* (60  $\mu\text{L}$ , 0.05 U/mL, final concentration), tested compound (3  $\mu\text{L}$ , 0.001-1000 nM, final concentrations) and 1% w/v Bovine Albumin Serum phosphate-buffered (pH= 8.0) solution (BSA, 60  $\mu\text{L}$ ). Inhibition curves were built by pre-incubating this blend at room temperature with nine concentrations of each compound for 10 min. A control with no compound was always present to determine the percent of enzymatic activity. After this pre-incubation period, acetylthiocholine iodide (105  $\mu\text{L}$ , 0.35 mM, final concentration) or butyrylthiocholine iodide (150  $\mu\text{L}$ , 0.5 mM, final concentration) was added, allowing 15 min of additional incubation time, where the DTNB produces the yellow anion 5-thio-2-nitrobenzoic acid as an indicator of enzymatic activity. After 15 min, absorbances were measured at 412 nm in a spectrophotometer plate reader (iEMS Reader MF, Labsystems). Color generation would be reduced as the compound inhibits the enzymes.  $\text{IC}_{50}$  values were calculated graphically at the concentration of compound that decreases 50% of the enzymatic activity by using a nonlinear regression method (four parameter logistic method). Data are expressed as means  $\pm$  SEM of at least three different experiments in quadruplicate.

### Inhibition of *hAChE* and *hBuChE* for the B series

The capacity of the adducts **B1-B14** to inhibit cholinesterases activity was assessed using the Ellman's method.<sup>311</sup> Initial rate assays were performed at 37 °C with a Jasco V-530 double beam Spectrophotometer by following the rate of increase in the absorbance at 412 nm for 210 s. AChE stock solution was prepared by dissolving human recombinant AChE (E.C.3.1.1.7) lyophilized powder (Sigma, Italy) in 0.1 M phosphate buffer (pH= 8.0) containing Triton X-100 0.1%. Stock solution of BuChE (E.C. 3.1.1.8) from human serum (Sigma, Italy) was prepared by dissolving the lyophilized powder in an aqueous solution of gelatine 0.1%. The final assay solution consisted of a 0.1 M phosphate buffer (pH= 8.0), with the addition of 340  $\mu\text{M}$  5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), 0.02 unit/mL of human recombinant AChE, or BuChE from human serum and 550  $\mu\text{M}$  of substrate (acetylthiocholine iodide, ATCh or butyrylthiocholine iodide, BTCh, respectively). Stock solutions of tested compounds were prepared in methanol. Five different concentrations of inhibitor were selected in order to

obtain inhibition of the enzymatic activity comprised between 20% and 80%. Assays were carried out with a blank containing all components except hAChE or hBuChE in order to account for the non-enzymatic reaction. Assay solutions (with and without inhibitor) were preincubated for 20 min at 37 °C before the addition of substrate. The reaction rates were compared and the percent inhibition due to the presence of increasing concentrations of inhibitor was calculated. Each concentration was analyzed in duplicate, and IC<sub>50</sub> values were determined graphically from log concentration–% inhibition curves (GraphPad Prism 4.03 software, GraphPad Software Inc.).

### Kinetic inhibition studies

To estimate the mode of inhibition of adduct **B8**, Lineweaver-Burk double reciprocal plots were constructed at relatively low concentration of substrate (0.11-0.56 mM). The plots were assessed by a weighted least square analysis that assumed the variance of  $v$  to be a constant percentage of  $v$  for the entire data set. Data analysis was performed with GraphPad Prism 4.03 software (GraphPad Software Inc.). Calculation of the inhibitor constant ( $K_i$ ) value was carried out by re-plotting slopes of lines from the Lineweaver-Burk plot *versus* the inhibitor concentration and  $K_i$  was determined as the intersect on the negative x-axis.  $K'_i$  (dissociation constant for the enzyme-substrate-inhibitor complex) value was determined by plotting the apparent  $1/v_{\max}$  *versus* inhibitor concentration.<sup>326</sup>

### Antioxydant Power

#### DPPH radical scavenging test for the A series<sup>312</sup>

The assay was carried out in 96-well microplates (Nunc) and the final reaction mixture was 200  $\mu$ L per well. A methanolic DPPH solution ( $1.5 \times 10^{-4}$  M, final concentration, 2.7 mL) was mixed with different concentrations of adducts (10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350  $\mu$ M, final concentration, 0.3 mL) prepared freshly from a methanolic stock solution ( $10^{-3}$  M). The resulting blend was incubated for 2h at room temperature in the dark. After this time, 200  $\mu$ L was placed in 96-well plate and the absorbance was measured at 517 nm in a spectrophotometer plate reader (iEMS Reader MF, Labsystems). Three consecutive runs were performed for each sample. The antioxydant capacity was determined as the %RSA (Radical Scavenging Test), calculated as follows :  $\%RSA = 100 \times [(A_0 - A_i)/A_0]$  ; where  $A_0$  and  $A_i$  represents the DPPH absorbance in absence and in presence of added adduct concentration  $i$ , respectively. Data are expressed as  $\pm$ SD.

#### Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for the B, C, D and E series

The radical scavenging capacity of the **B**, **C**, **D** and **E** series was determined by the ORAC-FL method using fluorescein as a fluorescent probe.<sup>331,332</sup> ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), fluorescein (FL) and 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) were purchased from Sigma-Aldrich. A Varioskan Flash plate reader with built-in injectors (Thermo Scientific) was used. The reaction was carried out at 37 °C in 75 mM phosphate buffer (pH= 7.4), and the final volume reaction mixture was 200  $\mu$ L. The tested compounds and Trolox standard were dissolved in DMSO to 10 mM and further diluted in 75 mM phosphate buffer (pH= 7.4). The final concentrations were 0.1-1  $\mu$ M for the tested compounds and 1-8  $\mu$ M for Trolox standard. The blank was composed of 120  $\mu$ L of FL, 60  $\mu$ L of AAPH and 20  $\mu$ L of phosphate buffer (pH=7.4) and was added in each assay. In a black 96-well microplate (Nunc), antioxidant (20

μL) and fluorescein (FL, 120 μL, final concentration of 70 nM) were incubated for 15 min at 37°C. Then, 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride (AAPH, 60 μL, final concentration of 40 mM) solution was added rapidly using the built-in injector. The fluorescence was measured every minute for 60 min at 485 nm (excitation wavelength) and 535 nm (emission wavelength). The microplate was automatically shaken prior to each reading. All the reactions were made in triplicate and at least three different assays were performed for each sample. Antioxidant curves (fluorescence versus time) were first normalized to the curve of the blank (without antioxidant) and then, the area under the fluorescence decay curve (AUC) was calculated as:  $AUC = 1 + \sum (f_i/f_0)$ , Where  $f_0$  is the initial fluorescence reading at 0 min and  $f_i$  is the fluorescence value at time  $i$ .

The net AUC corresponding to a sample was calculated as follows:

$$\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{antioxidant}} - \text{AUC}_{\text{blank}}.$$

Regression equations were calculated by plotting the net AUC against the antioxidant concentration. The ORAC value was obtained by dividing the slope of the latter curve between the slope of the Trolox curve obtained in the same assay. Final ORAC values were expressed as trolox equivalents (μmol of Trolox equivalent/μmol of adduct). Data are expressed as means ±SD.

### **Inhibition of Aβ<sub>1-42</sub> self-aggregation for the B series**

1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) pre-treated Aβ<sub>1-42</sub> samples (Bachem AG, Switzerland) were resolubilized with a MeCN/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaOH (48.4/48.4/3.2) mixture to have a stable stock solution ([Aβ<sub>1-42</sub>] = 500 μM).<sup>335</sup> Experiments were performed by incubating the peptide in 10 mM phosphate buffer (pH = 8.0) containing 10 mM NaCl, at 30 °C for 24 h (final Aβ concentration = 50 μM) with and without inhibitor (50 μM). The inhibitor was dissolved in methanol and diluted in the assay buffer. Blanks containing inhibitor and ThT were also prepared and evaluated to account for quenching and fluorescence properties. To quantify amyloid fibril formation, the ThT fluorescence method was used.<sup>362,363</sup> After incubation, samples were diluted to a final volume of 2.0 mL with 50 μM glycine-NaOH buffer (pH = 8.5) containing 1.5 μM ThT. A 300-seconds-time scan of fluorescence intensity was carried out ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 446 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  = 490 nm), and values at plateau were averaged after subtracting the background fluorescence of 1.5 μM ThT solution. The fluorescence intensities were compared and the % inhibition was calculated.

### **Docking simulations for the adduct B5 and B8**

The geometry of the ligands were optimized using the ab initio quantum chemistry program Gaussian 09 and the B3LYP/3-21G\* basis set. A set of atom-centred RHF 6-31G\* charges was then obtained by using the RESP methodology.<sup>364</sup> The crystallographic structure of human acetyl- (PDB code: 4EY7)<sup>338</sup> and butyrylcholinesterase (PDB code: 4BDS)<sup>339</sup> were retrieved from the Protein Data Bank as target proteins. Missing atoms were reconstructed with SwissPDB Viewer 4.1.0.<sup>365</sup> The docking experiments were carried out using the Lamarckian genetic algorithm implemented in the AutoDock 4.2 program.<sup>340</sup> A box encompassing both the CAS and the PAS site was defined for the exploration of possible binding modes. A volume for exploration was defined in the shape of a three-dimensional cubic grid (60 x 74 x 60 Å<sup>3</sup>) at a resolution of 0.3 Å and centered on the gorge that enclosed the regions that are known to make up the inhibitors binding pockets and modes. Affinity grid files were generated using the auxiliary program AutoGrid. At each grid point, the receptor's atomic affinity potentials for carbon, oxygen, nitrogen, chloro and hydrogen atoms present in the

ligand were precalculated for rapid intra- and intermolecular energy evaluation of the docking solution. Different conformers of the ligands were docked by randomly changing the torsion angles and overall orientation of the molecule. The receptor residues Trp286, Tyr124, Tyr337, Tyr72, Asp74, Thr75, Trp86, and Tyr341 were selected to keep flexible during docking simulation with the AutoTors module. The program searched until a maximum of 100 conformations and the procedure was repeated 100 times (runs). After docking, the 100 solutions were clustered in groups with RMSD less than 1.5 Å. The clusters were ranked by the lowest energy representative of each cluster. For all other parameters, the default values were used with AutoDock Tools.

The docking method with the inclusion of seven structural water molecules was performed with the program Gold v.5.2 according to the method published by Darras *et al.*<sup>341,342</sup> In preliminary docking runs, the tacrine showed hydrogen bond interactions to the catalytic Ser203. Thus, a mild hydrogen bond constraint was placed on the hydroxyl oxygen to obtain an optimized binding pose. The top scored pose is shown in figure III.5 (chapter III). Distances were measured between heavy atoms or between the heavy atom and the geometric centre of the His-ring in PyMOL.<sup>343</sup>



# RÉFÉRENCES



## Références

- (1) Alzheimer, A. Über Einen Eigenartigen, Schweren Erkrankungsprozeß Der Hirnrinde. *Neurol. Cent.* **1906**, 23, 1129–1136.
- (2) Photographie d'Alois Alzheimer, Site Web : <http://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/alzheimer.html>, Consulté Le 17/07/2014.
- (3) Photographie d'Auguste D., Site Web: <Http://rickolddoc.wordpress.com/author/ricktorbay-2/>, Consulté Le 17/07/2014.
- (4) Alzheimer, A. Concerning unusual medical cases in old age. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* **1911**, 4, 356–385.
- (5) Original Drawing of Alois Alzheimer of Neurofibrillary Tangles, <Http://www.alzheimer-adna.com/Neuropath/DNF.html>, consulté Le 09/06/2014.
- (6) Jervis, G. A.; Soltz, S. E. Alzheimer's Disease-The So-Called Juvenile Type (With Report of a Case). *Am. J. Psychiatry* **1936**, 93, 39–56.
- (7) Jellinger, K. A. Alzheimer 100 – Highlights in the History of Alzheimer Research. *J. Neural Transm.* **2006**, 113, 1603–1623.
- (8) <Http://www.francealzheimer.org/comprendre-maladie/chiffres/692>, Consulté Le 09/06/2014.
- (9) Folstein, M. F.; Folstein, S. E.; McHugh, P. R. "Mini-Mental State": A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *J. Psychiatr. Res.* **1975**, 12, 189–198.
- (10) Thomas-Antérion, C.; Mahieux, F. Les Troubles Cognitifs de La Maladie d'Alzheimer et Des Syndromes Apparentés : Pourquoi et Comment Les Explorer ? *NPG Neurol. - Psychiatr. - Gériatrie* **2009**, 9, 183–190.
- (11) Hampel, H.; Lista, S.; Khachaturian, Z. S. Development of Biomarkers to Chart All Alzheimer's Disease Stages: The Royal Road to Cutting the Therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement.* **2012**, 8, 312–336.
- (12) Jack Jr., C. R.; Holtzman, D. M. Biomarker Modeling of Alzheimer's Disease. *Neuron* **2013**, 80, 1347–1358.
- (13) Amyloid PET Studies, <Http://www.molecularimaging.net/topics/molecular-imaging/neuroimaging/spotlight-Alzheimers-Disease>, Consulté Le 12/06/2014, Source de L'image : University of Tennessee, Knoxville.
- (14) Hye, A.; Riddoch-Contreras, J.; Baird, A. L.; Ashton, N. J.; Bazenet, C.; Leung, R.; Westman, E.; Simmons, A.; Dobson, R.; Sattlecker, M.; Lupton, M.; Lunnon, K.; Keohane, A.; Ward, M.; Pike, I.; Zucht, H. D.; Pepin, D.; Zheng, W.; Tunnicliffe, A.; Richardson, J.; Gauthier, S.; Soininen, H.; Kłoszewska, I.; Mecocci, P.; Tsolaki, M.; Vellas, B.; Lovestone, S. Plasma Proteins Predict Conversion to Dementia from Prodromal Disease. *Alzheimers Dement.* **2014**, sous presse.
- (15) Henriksen, K.; O'Bryant, S. E.; Hampel, H.; Trojanowski, J. Q.; Montine, T. J.; Jeromin, A.; Blennow, K.; Lönnborg, A.; Wyss-Coray, T.; Soares, H.; Bazenet, C.; Sjögren, M.; Hu, W.; Lovestone, S.; Karsdal, M. A.; Weiner, M. W. The Future of Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Alzheimers Dement.* **2014**, 10, 115–131.
- (16) Parihar, M. S.; Hemnani, T. Alzheimer's Disease Pathogenesis and Therapeutic Interventions. *J. Clin. Neurosci.* **2004**, 11, 456–467.
- (17) El Kadmiri, N.; Hamzi, K.; El Moutawakil, B.; Slassi, I.; Nadifi, S. Les Aspects Génétiques de La Maladie d'Alzheimer (Revue). *Pathol. Biol.* **2013**, 61, 228–238.



- (18) Wirth, M.; Haase, C. M.; Villeneuve, S.; Vogel, J.; Jagust, W. J. Neuroprotective Pathways: Lifestyle Activity, Brain Pathology, and Cognition in Cognitively Normal Older Adults. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1873–1882.
- (19) Van Den Heuvel, C.; Thornton, E.; Vink, R. Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease: A Review. In *Progress in Brain Research*; John T. Weber and Andrew I.R. Maas, Ed.; Neurotrauma: New Insights into Pathology and Treatment; Elsevier, 2007; Vol. Volume 161, pp. 303–316.
- (20) Profenno, L. A.; Porsteinsson, A. P.; Faraone, S. V. Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. *Biol. Psychiatry* **2010**, *67*, 505–512.
- (21) Alzheimer's Disease Genetics Fact Sheet  
<http://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet> (accessed Jun 29, 2014).
- (22) Baig, S.; Joseph, S. A.; Tayler, H.; Abraham, R.; Owen, M. J.; Williams, J.; Kehoe, P. G.; Love, S. Distribution and Expression of Picalm in Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2010**, *69*, 1071–1077.
- (23) Crehan, H.; Holton, P.; Wray, S.; Pocock, J.; Guerreiro, R.; Hardy, J. Complement Receptor 1 (CR1) and Alzheimer's Disease. *Immunobiology* **2012**, *217*, 244–250.
- (24) Wu, Z.-C.; Yu, J.-T.; Li, Y.; Tan, L. Clusterin in Alzheimer's Disease. *Adv. Clin. Chem.* **2012**, *56*, 155–173.
- (25) Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 383–388.
- (26) Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184–185.
- (27) Korszyn, A. D. The Amyloid Cascade Hypothesis. *Alzheimers Dement.* **2008**, *4*, 176–178.
- (28) Bell, K. F. S.; Zheng, L.; Fahrenholz, F.; Cuellar, A. C. ADAM-10 over-Expression Increases Cortical Synaptogenesis. *Neurobiol. Aging* **2008**, *29*, 554–565.
- (29) Fahrenholz, F.; Postina, R. Alpha-Secretase Activation: An Approach to Alzheimer's Disease Therapy. *Neurodegener. Dis.* **2006**, *3*, 255–261.
- (30) Han, W.; Ji, T.; Mei, B.; Su, J. Peptide p3 May Play a Neuroprotective Role in the Brain. *Med. Hypotheses* **2011**, *76*, 543–546.
- (31) Wei, W.; Norton, D. D.; Wang, X.; Kusiak, J. W. Abeta 17-42 in Alzheimer's Disease Activates JNK and Caspase-8 Leading to Neuronal Apoptosis. *Brain J. Neurol.* **2002**, *125*, 2036–2043.
- (32) Cole, S. L.; Vassar, R. The Alzheimer's Disease B-Secretase Enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* **2007**, *2*, 22.
- (33) Lu, J.-X.; Qiang, W.; Yau, W.-M.; Schwieters, C. D.; Meredith, S. C.; Tycko, R. Molecular Structure of B-Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue. *Cell* **2013**, *154*, 1257–1268.
- (34) Abuznait, A. H.; Kaddoumi, A. Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 820–831.
- (35) Schéma Librement Inspiré Du Dessin Original Du Dr. Yan Liang. Copyright Emory University.  
Lien Web : [http://www.chemistry.emory.edu/faculty/lynn/Yan\\_Liang.html](http://www.chemistry.emory.edu/faculty/lynn/Yan_Liang.html).
- (36) Brion, J.-P.; Flament-Durand, J.; Dustin, P. Alzheimer's Disease and Tau Proteins. *The Lancet* **1986**, *328*, 1098.

- (37) Brion, J.-P.; Passareiro, H.; Nunez, J.; Flament-Durand, J. Mise En Evidence Immunologique de La Proteine Tau Au Niveau Des Lesions de Dégénérescences Neurofibrillaires de La Maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol. Brux.* **1985**, *95*, 229–235.
- (38) Delacourte, A. Le Retour de La Protéine Tau. *La Recherche* **2003**, *10*, 44–38.
- (39) Wang, J.-Z.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. Kinases and Phosphatases and Tau Sites Involved in Alzheimer Neurofibrillary Degeneration. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *25*, 59–68.
- (40) Iqbal, K.; del C. Alonso, A.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C.-X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I. Tau Pathology in Alzheimer Disease and Other Tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2005**, *1739*, 198–210.
- (41) Cedazo-Mínguez, A.; Popescu, B. O.; Blanco-Millán, J. M.; Akterin, S.; Pei, J.-J.; Winblad, B.; Cowburn, R. F. Apolipoprotein E and B-Amyloid (1–42) Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ . *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 1152–1164.
- (42) Takashima, A.; Noguchi, K.; Sato, K.; Hoshino, T.; Imahori, K. Tau Protein Kinase I Is Essential for Amyloid Beta-Protein-Induced Neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 7789–7793.
- (43) Takashima, A.; Noguchi, K.; Michel, G.; Mercken, M.; Hoshi, M.; Ishiguro, K.; Imahori, K. Exposure of Rat Hippocampal Neurons to Amyloid B Peptide (25–35) Induces the Inactivation of Phosphatidyl Inositol-3 Kinase and the Activation of Tau Protein Kinase I/glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ . *Neurosci. Lett.* **1996**, *203*, 33–36.
- (44) Takashima, A.; Honda, T.; Yasutake, K.; Michel, G.; Murayama, O.; Murayama, M.; Ishiguro, K.; Yamaguchi, H. Activation of Tau Protein Kinase I/glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  by Amyloid B Peptide (25–35) Enhances Phosphorylation of Tau in Hippocampal Neurons. *Neurosci. Res.* **1998**, *31*, 317–323.
- (45) Ferreira, A. Selective Phosphorylation of Adult Tau Isoforms in Mature Hippocampal Neurons Exposed to Fibrillar A $\beta$ . *Mol. Cell. Neurosci.* **1997**, *9*, 220–234.
- (46) Garcia-Alloza, M.; Hirst, W. D.; Chen, C. P. L.-H.; Lasheras, B.; Francis, P. T.; Ramírez, M. J. Differential Involvement of 5-HT(1B/1D) and 5-HT<sub>6</sub> Receptors in Cognitive and Non-Cognitive Symptoms in Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2004**, *29*, 410–416.
- (47) Trillo, L.; Das, D.; Hsieh, W.; Medina, B.; Moghadam, S.; Lin, B.; Dang, V.; Sanchez, M. M.; De Miguel, Z.; Ashford, J. W.; Salehi, A. Ascending Monoaminergic Systems Alterations in Alzheimer's Disease. Translating Basic Science into Clinical Care. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2013**, *37*, 1363–1379.
- (48) Kemppainen, N.; Laine, M.; Laakso, M. P.; Kaasinen, V.; Någren, K.; Vahlberg, T.; Kurki, T.; Rinne, J. O. Hippocampal Dopamine D2 Receptors Correlate with Memory Functions in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *18*, 149–154.
- (49) Lanctôt, K. L.; Herrmann, N.; Mazzotta, P.; Khan, L. R.; Ingber, N. GABAergic Function in Alzheimer's Disease: Evidence for Dysfunction and Potential as a Therapeutic Target for the Treatment of Behavioural and Psychological Symptoms of Dementia. *Can. J. Psychiatry Rev. Can. Psychiatr.* **2004**, *49*, 439–453.
- (50) Naddafi, F.; Mirshafiey, A. The Neglected Role of Histamine in Alzheimer's Disease. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* **2013**, *28*, 327–336.
- (51) Manuel, I.; de San Román, E. G.; Giralto, M. T.; Ferrer, I.; Rodríguez-Puertas, R. Type-1 Cannabinoid Receptor Activity During Alzheimer's Disease Progression. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2014**, *sous presse*.

- (52) Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Segall, Y.; Ariel, N.; Cohen, S.; Velan, B.; Shafferman, A. Dissection of the Human Acetylcholinesterase Active Center Determinants of Substrate Specificity. Identification of Residues Constituting the Anionic Site, the Hydrophobic Site, and the Acyl Pocket. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 17083–17095.
- (53) Branduardi, D.; Gervasio, F. L.; Cavalli, A.; Recanatini, M.; Parrinello, M. The Role of the Peripheral Anionic Site and Cation- $\pi$  Interactions in the Ligand Penetration of the Human AChE Gorge. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9147–9155.
- (54) Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10282–10286.
- (55) Ikonomic, M. D.; Mufson, E. J.; Wu, J.; Bennett, D. A.; DeKosky, S. T. Reduction of Choline Acetyltransferase Activity in Primary Visual Cortex in Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *Arch. Neurol.* **2005**, *62*, 425–430.
- (56) Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141–41147.
- (57) Darvesh, S.; Grantham, D. L.; Hopkins, D. A. Distribution of Butyrylcholinesterase in the Human Amygdala and Hippocampal Formation. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *393*, 374–390.
- (58) Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131–138.
- (59) Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 821–827.
- (60) Pedersen, W. A.; Kloczewiak, M. A.; Blusztajn, J. K. Amyloid Beta-Protein Reduces Acetylcholine Synthesis in a Cell Line Derived from Cholinergic Neurons of the Basal Forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 8068–8071.
- (61) Kar, S.; Issa, A. M.; Seto, D.; Auld, D. S.; Collier, B.; Quirion, R. Amyloid B-Peptide Inhibits High-Affinity Choline Uptake and Acetylcholine Release in Rat Hippocampal Slices. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 2179–2187.
- (62) Hellström-Lindahl, E. Modulation of B-Amyloid Precursor Protein Processing and Tau Phosphorylation by Acetylcholine Receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *393*, 255–263.
- (63) Duyckaerts, C.; Colle, M. A.; Delatour, B.; Hauw, J. J. Maladie d'Alzheimer: Les Lésions et Leur Progression. *Rev Neurol Paris* **1999**, *155*, 17–27.
- (64) Hock, C.; Maddalena, A.; Raschig, A.; Müller-Spahn, F.; Eschweiler, G.; Huger, K.; Hewer, I.; Hampel, H.; Müller-Thorntsen, T.; Oertel, W.; Wienrich, M.; Signorell, A.; Gonzalez-agosti, C.; Nitsch, R. M. Treatment with the Selective Muscarinic M1 Agonist Talsaclidine Decreases Cerebrospinal Fluid Levels of A $\beta$ 42 in Patients with Alzheimer's Disease. *Amyloid* **2003**, *10*, 1–6.
- (65) Kojro, E.; Fahrenholz, F. The Non-Amyloidogenic Pathway: Structure and Function of A-Secretases. In *Alzheimer's Disease*; Harris, J. R.; Fahrenholz, F., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer US, 2005; pp. 105–127.
- (66) Alvarez, A.; Bronfman, F.; Pérez, C. A.; Vicente, M.; Garrido, J.; Inestrosa, N. C. Acetylcholinesterase, a Senile Plaque Component, Affects the Fibrillogenesis of Amyloid-B-Peptides. *Neurosci. Lett.* **1995**, *201*, 49–52.

- (67) Alvarez, A.; Opazo, C.; Alarcón, R.; Garrido, J.; Inestrosa, N. C. Acetylcholinesterase Promotes the Aggregation of Amyloid-B-Peptide Fragments by Forming a Complex with the Growing Fibrils. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 348–361.
- (68) Rees, T.; Hammond, P. I.; Soreq, H.; Younkin, S.; Brimijoin, S. Acetylcholinesterase Promotes Beta-Amyloid Plaques in Cerebral Cortex. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 777–787.
- (69) Tasker, A.; Perry, E. K.; Ballard, C. G. Butyrylcholinesterase: Impact on Symptoms and Progression of Cognitive Impairment. *Expert Rev. Neurother.* **2005**, *5*, 101–106.
- (70) Furukawa-Hibi, Y.; Alkam, T.; Nitta, A.; Matsuyama, A.; Mizoguchi, H.; Suzuki, K.; Moussaoui, S.; Yu, Q.-S.; Greig, N. H.; Nagai, T.; Yamada, K. Butyrylcholinesterase Inhibitors Ameliorate Cognitive Dysfunction Induced by Amyloid-B Peptide in Mice. *Behav. Brain Res.* **2011**, *225*, 222–229.
- (71) Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid-B-Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron* **1996**, *16*, 881–891.
- (72) Niciu, M. J.; Kelmendi, B.; Sanacora, G. Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2012**, *100*, 656–664.
- (73) Dong, X.; Wang, Y.; Qin, Z. Molecular Mechanisms of Excitotoxicity and Their Relevance to Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **2009**, *30*, 379–387.
- (74) Hynd, M. R.; Scott, H. L.; Dodd, P. R. Glutamate-Mediated Excitotoxicity and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Neurochem. Int.* **2004**, *45*, 583–595.
- (75) Chen, Z.; Zhong, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Neurosci. Bull.* **2014**, *30*, 271–281.
- (76) Sokoloff, L. Energetics of Functional Activation in Neural Tissues. *Neurochem. Res.* **1999**, *24*, 321–329.
- (77) Praticò, D. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease: A Reappraisal. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 609–615.
- (78) Praticò, D.; Sung, S. Lipid Peroxidation and Oxidative Imbalance: Early Functional Events in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2004**, *6*, 171–175.
- (79) Federico, A.; Cardaioli, E.; Da Pozzo, P.; Formichi, P.; Gallus, G. N.; Radi, E. Mitochondria, Oxidative Stress and Neurodegeneration. *J. Neurol. Sci.* **2012**, *322*, 254–262.
- (80) Yan, M. H.; Wang, X.; Zhu, X. Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Alzheimer Disease and Parkinson Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *62*, 90–101.
- (81) Von Bernhardi, R.; Eugenin, J. Alzheimer's Disease: Redox Dysregulation As a Common Denominator for Diverse Pathogenic Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *16*, 974–1031.
- (82) Greenough, M. A.; Camakaris, J.; Bush, A. I. Metal Dyshomeostasis and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 540–555.
- (83) Candore, G.; Bulati, M.; Caruso, C.; Castiglia, L.; Colonna-Romano, G.; Di Bona, D.; Duro, G.; Lio, D.; Matranga, D.; Pellicanò, M.; Rizzo, C.; Scapagnini, G.; Vasto, S. Inflammation, Cytokines, Immune Response, Apolipoprotein E, Cholesterol, and Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Therapeutic Implications. *Rejuvenation Res.* **2010**, *13*, 301–313.

- (84) Lee, Y.-J.; Han, S. B.; Nam, S.-Y.; Oh, K.-W.; Hong, J. T. Inflammation and Alzheimer's Disease. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 1539–1556.
- (85) Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, A.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2821–2831.
- (86) Lin, M. T.; Beal, M. F. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Nature* **2006**, *443*, 787–795.
- (87) Ankarcrona, M.; Mangialasche, F.; Winblad, B. Rethinking Alzheimer's Disease Therapy: Are Mitochondria the Key? *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20*, 579–590.
- (88) Tan, S.; Sagara, Y.; Liu, Y.; Maher, P.; Schubert, D. The Regulation of Reactive Oxygen Species Production during Programmed Cell Death. *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 1423–1432.
- (89) Grivennikova, V. G.; Vinogradov, A. D. Generation of Superoxide by the Mitochondrial Complex I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2006**, *1757*, 553–561.
- (90) Chaturvedi, R. K.; Beal, M. F. Mitochondrial Approaches for Neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1147*, 395–412.
- (91) Casley, C. S.; Canevari, L.; Land, J. M.; Clark, J. B.; Sharpe, M. A. B-Amyloid Inhibits Integrated Mitochondrial Respiration and Key Enzyme Activities. *J. Neurochem.* **2002**, *80*, 91–100.
- (92) Wang, X.; Su, B.; Siedlak, S. L.; Moreira, P. I.; Fujioka, H.; Wang, Y.; Casadesus, G.; Zhu, X. Amyloid-B Overproduction Causes Abnormal Mitochondrial Dynamics via Differential Modulation of Mitochondrial Fission/fusion Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 19318–19323.
- (93) Yan, S. D.; Stern, D. M. Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: Role of Amyloid-B Peptide Alcohol Dehydrogenase (ABAD). *Int. J. Exp. Pathol.* **2005**, *86*, 161–171.
- (94) Bush, A. I. The Metal Theory of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *33*, S277–S281.
- (95) Popescu, B. F.; Nichol, H. Mapping Brain Metals to Evaluate Therapies for Neurodegenerative Disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2011**, *17*, 256–268.
- (96) Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R. Copper, Iron and Zinc in Alzheimer's Disease Senile Plaques. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158*, 47–52.
- (97) Yoshikawa, S.; Muramoto, K.; Shinzawa-Itoh, K. Proton-Pumping Mechanism of Cytochrome c Oxidase. *Annu. Rev. Biophys.* **2011**, *40*, 205–223.
- (98) Cerqueira, F. M.; Kowaltowski, A. J. Mitochondrial Metabolism in Aging: Effect of Dietary Interventions. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 22–28.
- (99) Jomova, K.; Vondrakova, D.; Lawson, M.; Valko, M. Metals, Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *345*, 91–104.
- (100) Mantyh, P. W.; Ghilardi, J. R.; Rogers, S.; DeMaster, E.; Allen, C. J.; Stimson, E. R.; Maggio, J. E. Aluminum, Iron, and Zinc Ions Promote Aggregation of Physiological Concentrations of B-Amyloid Peptide. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 1171–1174.
- (101) Pagel, K.; Seri, T.; von Berlepsch, H.; Griebel, J.; Kirmse, R.; Böttcher, C.; Koksche, B. How Metal Ions Affect Amyloid Formation: Cu<sup>2+</sup>- and Zn<sup>2+</sup>-Sensitive Peptides. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 531–536.



- (102) Sarell, C. J.; Wilkinson, S. R.; Viles, J. H. Substoichiometric Levels of Cu<sup>2+</sup> Ions Accelerate the Kinetics of Fiber Formation and Promote Cell Toxicity of Amyloid-B from Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41533–41540.
- (103) Rajendran, R.; Minqin, R.; Ynsa, M. D.; Casadesus, G.; Smith, M. A.; Perry, G.; Halliwell, B.; Watt, F. A Novel Approach to the Identification and Quantitative Elemental Analysis of Amyloid deposits—Insights into the Pathology of Alzheimer’s Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *382*, 91–95.
- (104) Savelieff, M. G.; Lee, S.; Liu, Y.; Lim, M. H. Untangling Amyloid-B, Tau, and Metals in Alzheimer’s Disease. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 856–865.
- (105) Khachaturian, Z. S. Calcium, Membranes, Aging, and Alzheimer’s Disease. Introduction and Overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, *568*, 1–4.
- (106) Mattson, M. P.; Cheng, B.; Davis, D.; Bryant, K.; Lieberburg, I.; Rydel, R. E. Beta-Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 376–389.
- (107) Demuro, A.; Parker, I.; Stutzmann, G. E. Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12463–12468.
- (108) Supnet, C.; Bezprozvanny, I. The Dysregulation of Intracellular Calcium in Alzheimer Disease. *Cell Calcium* **2010**, *47*, 183–189.
- (109) Khachaturian, Z. S. Calcium Hypothesis of Alzheimer’s Disease and Brain Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1994**, *747*, 1–11.
- (110) Pollard, H. B.; Rojas, E.; Arispe, N. A New Hypothesis for the Mechanism of Amyloid Toxicity, Based on the Calcium Channel Activity of Amyloid Beta Protein (A Beta P) in Phospholipid Bilayer Membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *695*, 165–168.
- (111) Li, S.; Hong, S.; Shepardson, N. E.; Walsh, D. M.; Shankar, G. M.; Selkoe, D. Soluble Oligomers of Amyloid Beta Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron* **2009**, *62*, 788–801.
- (112) Parsons, C. G.; Stöffler, A.; Danysz, W. Memantine: A NMDA Receptor Antagonist That Improves Memory by Restoration of Homeostasis in the Glutamatergic System--Too Little Activation Is Bad, Too Much Is Even Worse. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 699–723.
- (113) Davis, K. L.; Powchick, P. Tacrine. *The Lancet* **1995**, *345*, 625–630.
- (114) Tacrine : Un médicament dépassé à rejeter. *Rev. Prescrire* **1998**, *18*, 736–738.
- (115) Barner, E. L.; Gray, S. L. Donepezil Use in Alzheimer Disease. *Ann. Pharmacother.* **1998**, *32*, 70–77.
- (116) Harvey, A. L. The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogues. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *68*, 113–128.
- (117) Polinsky, R. J. Clinical Pharmacology of Rivastigmine: A New-Generation Acetylcholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Clin. Ther.* **1998**, *20*, 634–647.
- (118) Bai, D. L.; Tang, X. C.; He, X. C. Huperzine A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimer’s Disease. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 355–374.
- (119) Collingridge, G. The Role of NMDA Receptors in Learning and Memory. *Nature* **1987**, *330*, 604–605.
- (120) Estruch, R.; Martínez-González, M. A.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Covas, M. I.; Fiol, M.; Gómez-Gracia, E.; López-Sabater, M. C.; Vinyoles, E.; Arós, F.; Conde, M.; Lahoz, C.; Lapetra, J.; Sáez, G.; Ros, E. Effects of a Mediterranean-Style

- Diet on Cardiovascular Risk Factors A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* **2006**, *145*, 1–11.
- (121) Scarmeas, N.; Stern, Y.; Tang, M.-X.; Mayeux, R.; Luchsinger, J. A. Mediterranean Diet and Risk for Alzheimer's Disease. *Ann. Neurol.* **2006**, *59*, 912–921.
- (122) Jayasena, T.; Poljak, A.; Smythe, G.; Braid, N.; Münch, G.; Sachdev, P. The Role of Polyphenols in the Modulation of Sirtuins and Other Pathways Involved in Alzheimer's Disease. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 867–883.
- (123) Russo, A.; Palumbo, M.; Aliano, C.; Lempereur, L.; Scoto, G.; Renis, M. Red Wine Micronutrients as Protective Agents in Alzheimer-like Induced Insult. *Life Sci.* **2003**, *72*, 2369–2379.
- (124) Li, F.; Gong, Q.; Dong, H.; Shi, J. Resveratrol, a Neuroprotective Supplement for Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 27–33.
- (125) Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M. Curcumin and Alzheimer's Disease (Review). *CNS Neurosci. Ther.* **2010**, *16*, 285–297.
- (126) Lim, G. P.; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. The Curry Spice Curcumin Reduces Oxidative Damage and Amyloid Pathology in an Alzheimer Transgenic Mouse. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8370–8377.
- (127) Srinivasan, M.; Sudheer, A. R.; Menon, V. P. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2007**, *40*, 92–100.
- (128) Holmquist, L.; Stuchbury, G.; Berbaum, K.; Muscat, S.; Young, S.; Hager, K.; Engel, J.; Münch, G. Lipoic Acid as a Novel Treatment for Alzheimer's Disease and Related Dementias. *Pharmacol. Ther.* **2007**, *113*, 154–164.
- (129) Rosales-Corral, S. A.; Acuña-Castroviejo, D.; Coto-Montes, A.; Boga, J. A.; Manchester, L. C.; Fuentes-Broto, L.; Korkmaz, A.; Ma, S.; Tan, D.-X.; Reiter, R. J. Alzheimer's Disease: Pathological Mechanisms and the Beneficial Role of Melatonin. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 167–202.
- (130) Bonnefont-Rousselot, D.; Collin, F. Melatonin: Action as Antioxidant and Potential Applications in Human Disease and Aging. *Toxicology* **2010**, *278*, 55–67.
- (131) Edeas, M. Strategies to Target Mitochondria and Oxidative Stress by Antioxidants: Key Points and Perspectives. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2771–2779.
- (132) Murphy, M. P.; Smith, R. A. J. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 629–656.
- (133) Wilson, A. J.; Kerns, J. K.; Callahan, J. F.; Moody, C. J. Keap Calm, and Carry on Covalently. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7463–7476.
- (134) Van Muiswinkel, F.; Kuiperij, H. The Nrf2-ARE Signalling Pathway: Promising Drug Target to Combat Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. *Curr. Drug Targets-CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 267–281.
- (135) Satoh, T.; Lipton, S. A. Redox Regulation of Neuronal Survival Mediated by Electrophilic Compounds. *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 37–45.
- (136) Magesh, S.; Chen, Y.; Hu, L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 687–726.
- (137) Cuadrado, A.; Moreno-Murciano, P.; Pedraza-Chaverri, J. The Transcription Factor Nrf2 as a New Therapeutic Target in Parkinson's Disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 319–329.
- (138) Vargas, M. R.; Johnson, D. A.; Sirkis, D. W.; Messing, A.; Johnson, J. A. Nrf2 Activation in Astrocytes Protects against Neurodegeneration in Mouse Models of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 13574–13581.

- (139) Moret, V.; Laras, Y.; Pietrancosta, N.; Garino, C.; Quéléver, G.; Rolland, A.; Mallet, B.; Norreel, J.-C.; Kraus, J.-L. 1,1'-Xylyl Bis-1,4,8,11-Tetraaza Cyclotetradecane: A New Potential Copper Chelator Agent for Neuroprotection in Alzheimer's Disease. Its Comparative Effects with Clioquinol on Rat Brain Copper Distribution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3298–3301.
- (140) Melov, S. "...and C Is for Clioquinol" – the A $\beta$ Cs of Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 121–123.
- (141) Meade, T. W. Subacute Myelo-Optic Neuropathy and Clioquinol. An Epidemiological Case-History for Diagnosis. *Br. J. Prev. Soc. Med.* **1975**, *29*, 157–169.
- (142) Ritchie, C. W.; Bush, A. I.; Mackinnon, A.; Macfarlane, S.; Mastwyk, M.; MacGregor, L.; Kiers, L.; Cherny, R.; Li, Q.-X.; Tammer, A.; Carrington, D.; Mavros, C.; Volitakis, I.; Xilinas, M.; Ames, D.; Davis, S.; Beyreuther, K.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L. Metal-Protein Attenuation with Iodochlorhydroxyquin (clioquinol) Targeting Abeta Amyloid Deposition and Toxicity in Alzheimer Disease: A Pilot Phase 2 Clinical Trial. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1685–1691.
- (143) Lannfelt, L.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Batsman, S.; Ames, D.; Harrison, J.; Masters, C. L.; Targum, S.; Bush, A. I.; Murdoch, R.; Wilson, J.; Ritchie, C. W. Safety, Efficacy, and Biomarker Findings of PBT2 in Targeting A $\beta$  as a Modifying Therapy for Alzheimer's Disease: A Phase IIa, Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 779–786.
- (144) Adlard, P. A.; Cherny, R. A.; Finkelstein, D. I.; Gautier, E.; Robb, E.; Cortes, M.; Volitakis, I.; Liu, X.; Smith, J. P.; Perez, K.; Laughton, K.; Li, Q.-X.; Charman, S. A.; Nicolazzo, J. A.; Wilkins, S.; Deleva, K.; Lynch, T.; Kok, G.; Ritchie, C. W.; Tanzi, R. E.; Cappai, R.; Masters, C. L.; Barnham, K. J.; Bush, A. I. Rapid Restoration of Cognition in Alzheimer's Transgenic Mice with 8-Hydroxy Quinoline Analogs Is Associated with Decreased Interstitial A $\beta$ . *Neuron* **2008**, *59*, 43–55.
- (145) Benhamú, B.; Martín-Fontecha, M.; Vázquez-Villa, H.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M. L. Serotonin 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonists for the Treatment of Cognitive Deficiency in Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2014**, *sous presse*.
- (146) Ghosh, A. K.; Osswald, H. L. BACE1 ( $\beta$ -Secretase) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *sous presse*.
- (147) Chang, W.-P.; Huang, X.; Downs, D.; Cirrito, J. R.; Koelsch, G.; Holtzman, D. M.; Ghosh, A. K.; Tang, J. B-Secretase Inhibitor GRL-8234 Rescues Age-Related Cognitive Decline in APP Transgenic Mice. *FASEB J.* **2011**, *25*, 775–784.
- (148) Lilly Voluntarily Terminates Phase II Study for LY2886721, a Beta Secretase Inhibitor, Being Investigated as a Treatment for Alzheimer's Disease, Site Web: <https://investor.lilly.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=771353>, Consulté Le 09/07/2014.
- (149) Astrazeneca Pipeline, Lien Web Pdf: [http://www.astrazeneca-annualreports.com/2012/documents/eng\\_download\\_centre/additional-Information/astrazeneca-ar12-Dev-Pipeline.pdf](http://www.astrazeneca-annualreports.com/2012/documents/eng_download_centre/additional-Information/astrazeneca-ar12-Dev-Pipeline.pdf), Consulté Le 09/07/2014.
- (150) Yuan, J.; Venkatraman, S.; Zheng, Y.; McKeever, B. M.; Dillard, L. W.; Singh, S. B. Structure-Based Design of B-Site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4156–4180.
- (151) Guardia-Laguarta, C.; Pera, M.; Lleó, A. Gamma-Secretase as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 506–517.



- (152) Lleó, A. Activity of Gamma-Secretase on Substrates Other than APP. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 9–16.
- (153) Doody, R. S.; Raman, R.; Farlow, M.; Iwatsubo, T.; Vellas, B.; Joffe, S.; Kieburtz, K.; He, F.; Sun, X.; Thomas, R. G.; Aisen, P. S.; Siemers, E.; Sethuraman, G.; Mohs, R. A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 341–350.
- (154) Oehlrich, D.; Berthelot, D. J.-C.; Gijssen, H. J. M.  $\Gamma$ -Secretase Modulators as Potential Disease Modifying Anti-Alzheimer's Drugs. *J Med Chem* **2010**, *54*, 669–698.
- (155) Hopkins, C. R. ACS Chemical Neuroscience Molecule Spotlight on Begacestat (GSI-953). *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 3–4.
- (156) Wu, W.-L.; Domalski, M.; Burnett, D. A.; Josien, H.; Bara, T.; Rajagopalan, M.; Xu, R.; Clader, J.; Greenlee, W. J.; Brunskill, A.; Hyde, L. A.; Del Vecchio, R. A.; Cohen-Williams, M. E.; Song, L.; Lee, J.; Terracina, G.; Zhang, Q.; Nomeir, A.; Parker, E. M.; Zhang, L. Discovery of SCH 900229, a Potent Presenilin 1 Selective  $\Gamma$ -Secretase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 892–896.
- (157) NIC5-15, D-pinitol as gamma-secretase modulator <http://www.alzforum.org/therapeutics/nic5-15> (accessed Jul 9, 2014).
- (158) Delrieu, J.; Ousset, P. J.; Caillaud, C.; Vellas, B. "Clinical Trials in Alzheimer's Disease": Immunotherapy Approaches. *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 186–193.
- (159) Wang, Y.-J. Alzheimer Disease: Lessons from Immunotherapy for Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2014**, *10*, 188–189.
- (160) Panza, F.; Solfrizzi, V.; Imbimbo, B. P.; Tortelli, R.; Santamato, A.; Logroscino, G. Amyloid-Based Immunotherapy for Alzheimer's Disease in the Time of Prevention Trials: The Way Forward. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2014**, *10*, 405–419.
- (161) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. *J Med Chem* **2008**, *51*, 347–372.
- (162) León, R.; Garcia, A. G.; Marco-Contelles, J. Recent Advances in the Multitarget-Directed Ligands Approach for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 139–189.
- (163) Bansal, Y.; Silakari, O. Multifunctional Compounds: Smart Molecules for Multifactorial Diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 31–42.
- (164) Anighoro, A.; Bajorath, J.; Rastelli, G. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2014**, *sous presse*.
- (165) Yanez, M.; Vina, D. Dual Inhibitors of Monoamine Oxidase and Cholinesterase for the Treatment of Alzheimer Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1692–1706.
- (166) Bolea, I.; Gella, A.; Unzeta, M. Propargylamine-Derived Multitarget-Directed Ligands: Fighting Alzheimer's Disease with Monoamine Oxidase Inhibitors. *J. Neural Transm.* **2013**, *120*, 893–902.
- (167) Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; B.H. Youdim, M. Ladostigil: A Novel Multimodal Neuroprotective Drug with Cholinesterase and Brain-Selective Monoamine Oxidase Inhibitory Activities for Alzheimer's Disease Treatment. *Curr. Drug Targets* **2012**, *13*, 483–494.
- (168) Avraham Pharmaceuticals Announces Successful Interim Results in Phase 2b Study of Ladostigil for the Treatment of MCI | Business Wire <http://www.businesswire.com/news/home/20140708005778/en/Avraham->

- Pharmaceuticals-Announces-Successful-Interim-Results-Phase#.U8VFrUCRMTA (accessed Jul 15, 2014).
- (169) Pang, Y.-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-Tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase: Steps Toward Novel Drugs For Treating Alzheimer's Disease. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 23646–23649.
  - (170) Romero, A.; Cacabelos, R.; Oset-Gasque, M. J.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J. Novel Tacrine-Related Drugs as Potential Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1916–1922.
  - (171) Rosini, M.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Bolognesi, M. L.; Hrelia, P.; Minarini, A.; Tarozzi, A.; Melchiorre, C. Rational Approach To Discover Multipotent Anti-Alzheimer Drugs. *J Med Chem* **2004**, *48*, 360–363.
  - (172) Fang, L.; Kraus, B.; Lehmann, J.; Heilmann, J.; Zhang, Y.; Decker, M. Design and Synthesis of Tacrine–ferulic Acid Hybrids as Multi-Potent Anti-Alzheimer Drug Candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2905–2909.
  - (173) Lupp, A.; Appenroth, D.; Fang, L.; Decker, M.; Lehmann, J.; Fleck, C. Tacrine-NO Donor and Tacrine-Ferulic Acid Hybrid Molecules as New Anti-Alzheimer Agents: Hepatotoxicity and Influence on the Cytochrome P450 System in Comparison to Tacrine. *Arzneimittelforschung.* **2010**, *60*, 229–237.
  - (174) Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Campillo, N. E.; Páez, J. A.; González-Muñoz, G. C.; Usán, P.; García-Palomero, E.; López, M. G.; Villarroja, M.; García, A. G.; Martínez, A.; Rodríguez-Franco, M. I. Tacrine–Melatonin Hybrids as Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease, with Cholinergic, Antioxidant, and Neuroprotective Properties. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 828–841.
  - (175) Soukup, O.; Jun, D.; Zdarova-Karasova, J.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; Drtinova, L.; Pavlik, M.; Tobin, G.; Kuca, K. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *10*, 893–906.
  - (176) Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in Vitro Evaluation of N-Alkyl-7-Methoxytacrine Hydrochlorides as Potential Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer Disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6093–6095.
  - (177) Marco-Contelles, J.; León, R.; de los Ríos, C.; Samadi, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Huertas, O.; Barril, X.; Luque, F. J.; Rodríguez-Franco, M. I.; López, B.; López, M. G.; García, A. G.; do Carmo Carreiras, M.; Villarroja, M. Tacripyrines, the First Tacrine–Dihydropyridine Hybrids, as Multitarget-Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem* **2009**, *52*, 2724–2732.
  - (178) Muñoz-Torrero, D.; Camps, P. Dimeric and Hybrid Anti-Alzheimer Drug Candidates. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 399–422.
  - (179) Pudlo, M.; Luzet, V.; Ismaïli, L.; Tomassoli, I.; Iutzeler, A.; Refouvelet, B. Quinolone–benzylpiperidine Derivatives as Novel Acetylcholinesterase Inhibitor and Antioxidant Hybrids for Alzheimer Disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2496–2507.
  - (180) Luo, Z.; Sheng, J.; Sun, Y.; Lu, C.; Yan, J.; Liu, A.; Luo, H.; Huang, L.; Li, X. Synthesis and Evaluation of Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease Based on the Fusion of Donepezil and Ebselen. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9089–9099.
  - (181) Bolea, I.; Juárez-Jiménez, J.; de los Ríos, C.; Chioua, M.; Pouplana, R.; Luque, F. J.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J.; Samadi, A. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of Donepezil and N-[(5-(Benzyloxy)-1-Methyl-1H-Indol-2-

- YI)methyl]-N-Methylprop-2-Yn-1-Amine Hybrids as New Multipotent Cholinesterase/Monoamine Oxidase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8251–8270.
- (182) Samadi, A.; Marco Contelles, J. L.; Bolea Tomás, I.; Luque Garriga, F. J.; Unzeta López, M. New Derivatives of Propargylamine Having Neuroprotective Capacity for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. WO/2011/113988, September 23, 2011.
- (183) Bolea, I.; Gella, A.; Monjas, L.; Pérez, C.; Rodríguez-Franco, M. I.; Marco-Contelles, J.; Samadi, A.; Unzeta, M. Multipotent, Permeable Drug ASS234 Inhibits A $\beta$  Aggregation, Possesses Antioxidant Properties and Protects from A $\beta$ -Induced Apoptosis in Vitro. *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *10*, 797–808.
- (184) Melchiorre, C.; Andrisano, V.; Bolognesi, M. L.; Budriesi, R.; Cavalli, A.; Cavrini, V.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M. Acetylcholinesterase Noncovalent Inhibitors Based on a Polyamine Backbone for Potential Use against Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4186–4189.
- (185) Melchiorre, C.; Antonello, A.; Banzi, R.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V. Polymethylene Tetraamine Backbone as Template for the Development of Biologically Active Polyamines. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 200–233.
- (186) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Capsoni, S.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Margotti, E.; Cattaneo, A.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. A Small Molecule Targeting the Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3689–3692.
- (187) Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C. Memoquin: A Multi-Target-Directed Ligand as an Innovative Therapeutic Opportunity for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **2009**, *6*, 152–162.
- (188) Charkoudian, L. K.; Pham, D. M.; Franz, K. J. A Pro-Chelator Triggered by Hydrogen Peroxide Inhibits Iron-Promoted Hydroxyl Radical Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12424–12425.
- (189) Schugar, H.; Green, D. E.; Bowen, M. L.; Scott, L. E.; Storr, T.; Böhmerle, K.; Thomas, F.; Allen, D. D.; Lockman, P. R.; Merkel, M.; Thompson, K. H.; Orvig, C. Combating Alzheimer's Disease With Multifunctional Molecules Designed for Metal Passivation. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1746–1748.
- (190) Zheng, H.; Youdim, M. B. H.; Fridkin, M. Site-Activated Multifunctional Chelator with Acetylcholinesterase and Neuroprotective-Neurorestorative Moieties for Alzheimer's Therapy. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4095–4098.
- (191) *Multicomponent Reactions*; Zhu, J.; Bienaymé, H., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
- (192) Biggs-Houck, J. E.; Younai, A.; Shaw, J. T. Recent Advances in Multicomponent Reactions for Diversity-Oriented Synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 371–382.
- (193) Wetzal, S.; Bon, R. S.; Kumar, K.; Waldmann, H. Biology-Oriented Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10800–10826.
- (194) Strecker, A. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, *75*, 27–51.
- (195) Strecker, A. Ueber Einen Neuen Aus Aldehyd - Ammoniak Und Blausäure Entstehenden Körper. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1854**, *91*, 349–351.
- (196) Hantzsch, A. Ueber Die Synthese Pyridinartiger Verbindungen Aus Acetessigäther Und Aldehydammoniak. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1882**, *215*, 1–82.

- (197) Hantzsch, A. Neue Bildungsweise von Pyrrolderivaten. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, 23, 1474–1476.
- (198) Döbner, O. 1) Ueber A-Alkylcinchoninsäuren Und A-Alkylchinoline. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1887**, 242, 265–289.
- (199) Biginelli, P. Ueber Aldehyduramide Des Acetessigäthers. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, 24, 1317–1319.
- (200) Biginelli, P. Ueber Aldehyduramide Des Acetessigäthers. II. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, 24, 2962–2967.
- (201) Mannich, C.; Krösche, W. Ueber Ein Kondensationsprodukt Aus Formaldehyd, Ammoniak Und Antipyrin. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1912**, 250, 647–667.
- (202) Robinson, R. LXIII.—A Synthesis of Tropinone. *J. Chem. Soc. Trans.* **1917**, 111, 762–768.
- (203) Petasis, N. A.; Akritopoulou, I. The Boronic Acid Mannich Reaction: A New Method for the Synthesis of Geometrically Pure Allylamines. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 583–586.
- (204) Petasis, N. A.; Zavialov, I. A. A New and Practical Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids from Alkenyl Boronic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 445–446.
- (205) Kabachnik, M. I.; Medved, T. Y. Новый Метод Синтеза Сс-Аминофосфиновых Кислот. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1952**, 83, 689.
- (206) Fields, E. K. The Synthesis of Esters of Substituted Amino Phosphonic Acids 1a. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1528–1531.
- (207) Povarov, L. S.; Mikhailov, B. M. *Izv Akad Nauk SSR Ser Khim* **1963**, 953–956.
- (208) Caruana, L.; Fochi, M.; Ranieri, S.; Mazzanti, A.; Bernardi, L. Catalytic Highly Enantioselective Vinylogous Povarov Reaction. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 880–882.
- (209) Dagousset, G.; Retailleau, P.; Masson, G.; Zhu, J. Chiral Phosphoric Acid-Catalyzed Enantioselective Three-Component Povarov Reaction Using Cyclic Enethioureas as Dienophiles: Stereocontrolled Access to Enantioenriched Hexahydropyrroloquinolines. *Chem. – Eur. J.* **2012**, 18, 5869–5873.
- (210) Gewald, K.; Schinke, E.; Böttcher, H. Heterocyclen Aus CH-Aciden Nitrilen, VIII. 2-Amino-Thiophene Aus Methylenaktiven Nitrilen, Carbonylverbindungen Und Schwefel. *Chem. Ber.* **1966**, 99, 94–100.
- (211) Schiltz, A. *Nouvelle Préparation D'isonitriles et Application Aux Réactions Multicomposantss*; Palaiseau, Ecole polytechnique, 2010.
- (212) Ronsseray, C. *Des Isonitriles Aux Hydrazones: Réactions Multicomposantss et Synthèses D'hétérocycle*; Palaiseau, Ecole polytechnique, 2011.
- (213) Lieke, W. Ueber Das Cyanallyl. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1859**, 112, 316–321.
- (214) Gautier, A. Ueber Die Einwirkung Des Chlorwasserstoffs U. A. Auf Das Aethyl- Und Methylcyanür. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1867**, 142, 289–294.
- (215) Gautier, A. Ueber Eine Neue Reihe von Verbindungen, Welche Mit Den Cyanwasserstoffsäure-Aethern Isomer Sind. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1868**, 146, 119–124.
- (216) Hofmann, A. W. Ueber Eine Neue Reihe von Homologen Der Cyanwasserstoffsäure. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1867**, 144, 114–120.
- (217) Nef, J. U. Ueber Das Zweiwertthige Kohlenstoffatom. (Vierte Abhandlung.) Die Chemie Des Methylens. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1897**, 298, 202–374.
- (218) Weber, W. P.; Gokel, G. W.; Ugi, I. K. Phase Transfer Catalysis in the Hofmann Carbylamine Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, 11, 530–531.

- (219) Ugi, I.; Meyr, R. Neue Darstellungsmethode Für Isonitrile. *Angew. Chem.* **1958**, *70*, 702–703.
- (220) Ugi, I.; Meyr, R. Isonitrile, I. Darstellung von Isonitrilen Aus Monosubstituierten Formamiden Durch Wasserabspaltung. *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 239–248.
- (221) Obrecht, R.; Herrmann, R.; Ugi, I. Isocyanide Synthesis with Phosphoryl Chloride and Diisopropylamine. *Synthesis* **1985**, *1985*, 400–402.
- (222) Creedon, S. M.; Crowley, H. K.; McCarthy, D. G. Dehydration of Formamides Using the Burgess Reagent: A New Route to Isocyanides. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1998**, 1015–1018.
- (223) Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A. Thermal Reactions of Alkyl N-Carbomethoxysulfamate Esters. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 26–31.
- (224) Sharma, S.; Maurya, R. A.; Min, K.-I.; Jeong, G.-Y.; Kim, D.-P. Odorless Isocyanide Chemistry: An Integrated Microfluidic System for a Multistep Reaction Sequence. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7564–7568.
- (225) Mukaiyama, T.; Yokota, Y. The Deoxygenation of Isocyanates by 2-Phenyl-3-Methyl-1,3,2-Oxazaphospholidine. A Convenient Method for the Preparation of Isonitriles. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1965**, *38*, 858–859.
- (226) Baldwin, J. E.; Bottaro, J. C.; Riordan, P. D.; Derome, A. E. A New Method for the Reduction of Isocyanates to Isocyanides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 942–943.
- (227) Baldwin, J. E.; Derome, A. E.; Riordan, P. D. Deoxygenation of Isocyanates to Isonitriles : A Mechanistic Study by Nuclear Magnetic Resonance. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 2989–2994.
- (228) Hoy, D. J.; Poziomek, E. J. *Isocyanide Synthesis*; CRDLR-3329; CHEMICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT LABS EDGEWOOD ARSENAL MD, CHEMICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT LABS EDGEWOOD ARSENAL MD, 1965.
- (229) Gambaryan, N. P. *Progress in Isonitrile Chemistry*; FSTC-HT-23-257-68; ARMY FOREIGN SCIENCE AND TECHNOLOGY CENTER CHARLOTTESVILLE VA, ARMY FOREIGN SCIENCE AND TECHNOLOGY CENTER CHARLOTTESVILLE VA, 1968.
- (230) Kaïm, L. E.; Grimaud, L.; Schiltz, A. “Isocyanide-Free” Ugi Reactions. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3024–3026.
- (231) Kaim, L. E.; Grimaud, L.; Schiltz, A. One-Pot Synthesis of Oxazoles Using Isocyanide Surrogates. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5235–5237.
- (232) El Kaim, L.; Grimaud, L.; Schiltz, A. Isocyanide-Based Multicomponent Reaction “without” Isocyanides. *Synlett* **2009**, *2009*, 1401–1404.
- (233) Lindemann, H.; Wiegand, L. Über Die Konstitution Der Verbindungen Mit „zweiwertigem“ Kohlenstoff. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1930**, *63*, 1650–1657.
- (234) Chéron, N.; El Kaïm, L.; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. A Density Functional Theory Study of the Nef-Isocyanide Reaction: Mechanism, Influence of Parameters and Scope. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 10106–10112.
- (235) Dömling, A.; Ugi, I. Multicomponent Reactions with Isocyanides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168–3210.
- (236) Van Leusen, A. M.; Wildeman, J.; Oldenziel, O. H. Chemistry of Sulfonylmethyl Isocyanides. 12. Base-Induced Cycloaddition of Sulfonylmethyl Isocyanides to Carbon,nitrogen Double Bonds. Synthesis of 1,5-Disubstituted and 1,4,5-



- Trisubstituted Imidazoles from Aldimines and Imidoyl Chlorides. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1153–1159.
- (237) Van Leusen, A. M.; Boerma, G. J. M.; Helmholdt, R. B.; Siderius, H.; Strating, J. Chemistry of Sulfonylmethylisocyanides. Simple Synthetic Approaches to a New Versatile Chemical Building Block. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 2367–2368.
- (238) Schröder, R.; Schöllkopf, U.; Blume, E.; Hoppe, I. Synthesen Mit A-Metallierten Isocyaniden, XXVIII1) In 2-Stellung Unsubstituierte Oxazole Aus A-Metallierten Isocyaniden Und Acylierungsreagenzien. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1975**, *1975*, 533–546.
- (239) Van Nispen, S. P. J. M.; Bregman, J. H.; van Engen, D. G.; van Leusen, A. M.; Saikachi, H.; Kitagawa, T.; Sasaki, H. Synthesis of Thiazoles and Imidazoles from Isothiocyanates and Tosylmethyl Isocyanide. Base-Induced Ring Transformation of 5-Amino-1,3-Thiazoles to Imidazole-5-Thiols. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1982**, *101*, 28–34.
- (240) Zhang, B.; Mück-Lichtenfeld, C.; Daniliuc, C. G.; Studer, A. 6-Trifluoromethyl-Phenanthridines through Radical Trifluoromethylation of Isonitriles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10792–10795.
- (241) Nef, J. U. Ueber Das Zweiwerthige Kohlenstoffatom. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1894**, *280*, 291–342.
- (242) Periasamy, M. P.; Walborsky, H. M. Isocyanides. Dissociation of Metallo Aldimines. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 611–618.
- (243) Passerini, M.; Simone, L. *Gazzeta Chim. Ital.* **1921**, *51*, 126–129.
- (244) Banfi, L.; Riva, R. The Passerini Reaction. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- (245) Ugi, I.; Meyr, R. Isonitrile, V. Erweiterter Anwendungsbereich Der Passerini-Reaktion. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 2229–2233.
- (246) Mumm, O. Umsetzung von Säureimidchloriden Mit Salzen Organischer Säuren Und Mit Cyankalium. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43*, 886–893.
- (247) Ugi, I.; Meyr, R.; Steinbrückner, C. Versuche Mit Isonitrilen. *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 386.
- (248) Ugi, I.; Werner, B.; Dömling, A. The Chemistry of Isocyanides, Their MultiComponent Reactions and Their Libraries. *Molecules* **2003**, *8*, 53–66.
- (249) Chéron, N.; Ramozzi, R.; Kaïm, L. E.; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. Challenging 50 Years of Established Views on Ugi Reaction: A Theoretical Approach. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1361–1366.
- (250) Ugi, I.; Steinbrückner, C. Über Ein Neues Kondensations-Prinzip. *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 267–268.
- (251) Ugi, I. The A-Addition of Immonium Ions and Anions to Isonitriles Accompanied by Secondary Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1*, 8–21.
- (252) El Kaïm, L.; Grimaud, L.; Oble, J. Phenol Ugi–Smiles Systems: Strategies for the Multicomponent N-Arylation of Primary Amines with Isocyanides, Aldehydes, and Phenols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7961–7964.
- (253) El Kaïm, L.; Gizolme, M.; Grimaud, L.; Oble, J. Smiles Rearrangements in Ugi- and Passerini-Type Couplings: New Multicomponent Access to O- and N-Arylamides. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4169–4180.
- (254) Ugi, I.; Steinbrückner, C. Isonitrile, IX. A-Addition von Immonium-Ionen Und Carbonsäure-Anionen an Isonitrile. *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 2802–2814.

- (255) Giovenzana, G. B.; Tron, G. C.; Di Paola, S.; Menegotto, I. G.; Pirali, T. A Mimicry of Primary Amines by Bis-Secondary Diamines as Components in the Ugi Four-Component Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1099–1102.
- (256) Tron, G. C. Off the Beaten Track: The Use of Secondary Amines in the Ugi Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1849–1859.
- (257) Krasavin, M.; Bushkova, E.; Parchinsky, V.; Shumsky, A. Hydrazinopeptide Motifs Synthesized via the Ugi Reaction: An Insight into the Secondary Structure. *Synthesis* **2010**, *2010*, 933–942.
- (258) Maghari, S.; Ramezanpour, S.; Balalaie, S.; Darvish, F.; Rominger, F.; Bijanzadeh, H. R. Synthesis of Functionalized Pseudopeptides through Five-Component Sequential Ugi/Nucleophilic Reaction of N-Substituted 2-Alkynamides with Hydrazides. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6450–6456.
- (259) Ugi, I.; Bodesheim, F. Isonitrile, XIV. Umsetzung von Isonitrilen Mit Hydrazonen Und Carbonsäuren. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1963**, *666*, 61–64.
- (260) Basso, A.; Banfi, L.; Guanti, G.; Riva, R.; Riu, A. Ugi Multicomponent Reaction with Hydroxylamines: An Efficient Route to Hydroxamic Acid Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6109–6111.
- (261) Sañudo, M.; Marcaccini, S.; Basurto, S.; Torroba, T. Synthesis of 3-Hydroxy-6-oxo[1,2,4]triazin-1-Yl Alaninamides, a New Class of Cyclic Dipeptidyl Ureas. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4578–4584.
- (262) Groebke, K.; Weber, L.; Mehlin, F. Synthesis of Imidazo[1,2-A] Annulated Pyridines, Pyrazines and Pyrimidines by a Novel Three-Component Condensation. *Synlett* **1998**, *1998*, 661–663.
- (263) Blackburn, C.; Guan, B.; Fleming, P.; Shiosaki, K.; Tsai, S. Parallel Synthesis of 3-aminoimidazo[1,2-A]pyridines and Pyrazines by a New Three-Component Condensation. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3635–3638.
- (264) Bienaymé, H.; Bouzid, K. A New Heterocyclic Multicomponent Reaction For the Combinatorial Synthesis of Fused 3-Aminoimidazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2234–2237.
- (265) Hanusch-Kompa, C.; Ugi, I. Multi-Component Reactions 13: Synthesis of  $\gamma$ -Lactams as Part of a Multiring System via Ugi-4-Centre-3-Component Reaction. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2725–2728.
- (266) Dömling, A.; Starnecker, M.; Ugi, I. The B-Lactam-Nucleoside Chimera. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2238–2239.
- (267) Maison, W.; Lützen, A.; Kosten, M.; Schlemminger, I.; Westerhoff, O.; Saak, W.; Martens, J. Multicomponent Synthesis of Tripeptides Containing Pipecolic Acid Derivatives: Selective Induction of Cis- and Trans-Imide Bonds into Peptide Backbones. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2000**, 1867–1871.
- (268) Pirrung, M. C.; Sarma, K. D. B-Lactam Synthesis by Ugi Reaction of B-Keto Acids in Aqueous Solution. *Synlett* **2004**, 1425–1427.
- (269) Banfi, L.; Guanti, G.; Riva, R.; Basso, A.; Calcagno, E. Short Synthesis of Protease Inhibitors via Modified Passerini Condensation of N-Boc-A-Aminoaldehydes. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4067–4069.
- (270) Banfi, L.; Basso, A.; Guanti, G.; Riva, R. Passerini Reaction – Amine Deprotection – Acyl Migration (PADAM): A Convenient Strategy for the Solid-Phase Preparation of Peptidomimetic Compounds. *Mol. Divers.* **2003**, *6*, 227–235.

- (271) Moliner, F. D.; Bigatti, M.; Banfi, L.; Riva, R.; Basso, A. OPHA (Oxidation–Passerini–Hydrolysis–Alkylation) Strategy: A Four-Step, One-Pot Improvement of the Alkylative Passerini Reaction. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2280–2283.
- (272) Ngouansavanh, T.; Zhu, J. Alcohols in Isonitrile-Based Multicomponent Reaction: Passerini Reaction of Alcohols in the Presence of O-Iodoxybenzoic Acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3495–3497.
- (273) Hulme, C.; Bienaymé, H.; Nixey, T.; Chenera, B.; Jones, W.; Tempest, P.; Smith, A. L. Library Generation via Postcondensation Modifications of Isocyanide-Based Multicomponent Reactions. In *Combinatorial Chemistry, Part B*; Academic Press, 2003; Vol. Volume 369, pp. 469–496.
- (274) Xu, Z.; Shaw, A. Y.; Dietrich, J.; Cappelli, A. P.; Nichol, G.; Hulme, C. Facile, Novel Two-Step Syntheses of Benzimidazoles, Bis-Benzimidazoles, and Bis-Benzimidazole-Dihydroquinoxalines. *Mol. Divers.* **2012**, *16*, 73–79.
- (275) Gunawan, S.; Ayaz, M.; De Moliner, F.; Frett, B.; Kaiser, C.; Patrick, N.; Xu, Z.; Hulme, C. Synthesis of Tetrazolo-Fused Benzodiazepines and Benzodiazepinones by a Two-Step Protocol Using an Ugi-Azide Reaction for Initial Diversity Generation. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 5606–5611.
- (276) Nixey, T.; Tempest, P.; Hulme, C. Two-Step Solution-Phase Synthesis of Novel Quinoxalinones Utilizing a UDC (Ugi/de-Boc/cyclize) Strategy. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1637–1639.
- (277) Hulme, C.; Ma, L.; Cherrier, M.-P.; Romano, J. J.; Morton, G.; Duquenne, C.; Salvino, J.; Labaudiniere, R. Novel Applications of Convertible Isonitriles for the Synthesis of Mono and Bicyclic  $\Gamma$ -Lactams via a UDC Strategy. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1883–1887.
- (278) Hulme, C.; Peng, J.; Morton, G.; Salvino, J. M.; Herpin, T.; Labaudiniere, R. Novel Safety-Catch Linker and Its Application with a Ugi/De-BOC/Cyclization (UDC) Strategy to Access Carboxylic Acids, 1,4-Benzodiazepines, Diketopiperazines, Ketopiperazines and Dihydroquinoxalinones. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7227–7230.
- (279) Hulme, C.; Peng, J.; Tang, S.-Y.; Burns, C. J.; Morize, I.; Labaudiniere, R. Improved Procedure for the Solution Phase Preparation of 1,4-Benzodiazepine-2,5-Dione Libraries via Armstrong's Convertible Isonitrile and the Ugi Reaction. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8021–8023.
- (280) Wessjohann, L. A.; Rhoden, C. R. B.; Rivera, D. G.; Vercillo, O. E. *Synthesis of Heterocycles via Multicomponent Reactions I*; Orru, R. V. A.; Ruijter, E., Eds.; Topics in Heterocyclic Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; Vol. 23.
- (281) Banfi, L.; Basso, A.; Guanti, G.; Riva, R. Application of Tandem Ugi Reaction/ring-Closing Metathesis in Multicomponent Synthesis of Unsaturated Nine-Membered Lactams. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7655–7658.
- (282) Modha, S. G.; Kumar, A.; Vachhani, D. D.; Jacobs, J.; Sharma, S. K.; Parmar, V. S.; Van Meervelt, L.; Van der Eycken, E. V. A Diversity-Oriented Approach to Spiroindolines: Post-Ugi Gold-Catalyzed Diastereoselective Domino Cyclization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9572–9575.
- (283) Riva, R.; Banfi, L.; Basso, A.; Cerulli, V.; Guanti, G.; Pani, M. A Highly Convergent Synthesis of Tricyclic N-Heterocycles Coupling an Ugi Reaction with a Tandem SN2'-Heck Double Cyclization. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5134–5143.



- (284) Bonnaterre, F.; Bois-Choussy, M.; Zhu, J. Rapid Access to Oxindoles by the Combined Use of an Ugi Four-Component Reaction and a Microwave-Assisted Intramolecular Buchwald–Hartwig Amidation Reaction. *Org Lett* **2006**, *8*, 4351–4354.
- (285) Marcaccini, S.; Pepino, R.; Pozo, M. C.; Basurto, S.; García-Valverde, M.; Torroba, T. One-Pot Synthesis of Quinolin-2-(1H)-Ones via Tandem Ugi–Knoevenagel Condensations. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3999–4001.
- (286) Wang, W.; Ollio, S.; Herdtweck, E.; Dömling, A. Polycyclic Compounds by Ugi–Pictet–Spengler Sequence. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 637–644.
- (287) Beck, B.; Picard, A.; Herdtweck, E.; Dömling, A. Highly Substituted Pyrrolidinones and Pyridones by 4-CR/2-CR Sequence. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 39–42.
- (288) Kaïm, L. E.; Grimaud, L.; Miranda, L. D.; Vieu, E. Ugi/xanthate Cyclizations as a Radical Route to Lactam Scaffolds. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8259–8261.
- (289) Gordon, C. P.; Young, K. A.; Robertson, M. J.; Hill, T. A.; McCluskey, A. An Ugi–Intramolecular Diels–Alder Route to Highly Substituted Tetrahydroepoxyisoindole Carboxamides. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 554–561.
- (290) Akritopoulou-Zanze, I. Isocyanide-Based Multicomponent Reactions in Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 324–331.
- (291) Dömling, A.; Wang, W.; Wang, K. Chemistry and Biology Of Multicomponent Reactions. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3083–3135.
- (292) Turk, B. Targeting Proteases: Successes, Failures and Future Prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785–799.
- (293) Agüero, F.; Al-Lazikani, B.; Aslett, M.; Berriman, M.; Buckner, F. S.; Campbell, R. K.; Carmona, S.; Carruthers, I. M.; Chan, A. W. E.; Chen, F.; Crowther, G. J.; Doyle, M. A.; Hertz-Fowler, C.; Hopkins, A. L.; McAllister, G.; Nwaka, S.; Overington, J. P.; Pain, A.; Paolini, G. V.; Pieper, U.; Ralph, S. A.; Riechers, A.; Roos, D. S.; Sali, A.; Shanmugam, D.; Suzuki, T.; Van Voorhis, W. C.; Verlinde, C. L. M. J. Genomic-Scale Prioritization of Drug Targets: The TDR Targets Database. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 900–907.
- (294) Rossen, K.; Pye, P. J.; DiMichele, L. M.; Volante, R. P.; Reider, P. J. An Efficient Asymmetric Hydrogenation Approach to the Synthesis of the Crixivan® Piperazine Intermediate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6823–6826.
- (295) Lapenna, S.; Giordano, A. Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 547–566.
- (296) Sisko, J.; Mellinger, M. Development of a General Process for the Synthesis of Highly Substituted Imidazoles. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*.
- (297) Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Over One Hundred Peptide-Activated G Protein-Coupled Receptors Recognize Ligands with Turn Structure. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 793–826.
- (298) Ruiz-Gómez, G.; Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Update 1 of: Over One Hundred Peptide-Activated G Protein-Coupled Receptors Recognize Ligands with Turn Structure. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, PR1–PR41.
- (299) Liddle, J.; Allen, M. J.; Borthwick, A. D.; Brooks, D. P.; Davies, D. E.; Edwards, R. M.; Exall, A. M.; Hamlett, C.; Irving, W. R.; Mason, A. M.; McCafferty, G. P.; Nerozzi, F.; Peace, S.; Philp, J.; Pollard, D.; Pullen, M. A.; Shabbir, S. S.; Sollis, S. L.; Westfall, T. D.; Woollard, P. M.; Wu, C.; Hickey, D. M. B. The Discovery of GSK221149A: A Potent and Selective Oxytocin Antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 90–94.
- (300) Tomassoli, I.; Ismaili, L.; Pudlo, M.; de los Ríos, C.; Soriano, E.; Colmena, I.; Gandía, L.; Rivas, L.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J.; Refouvelet, B. Synthesis, Biological

- Assessment and Molecular Modeling of New Dihydroquinoline-3-Carboxamides and Dihydroquinoline-3-Carbohydrazide Derivatives as Cholinesterase Inhibitors, and Ca Channel Antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1–10.
- (301) Arunkhamkaew, S.; Athipornchai, A.; Apiratikul, N.; Suksamrarn, A.; Ajavakom, V. Novel Racemic Tetrahydrocurcuminoid Dihydropyrimidinone Analogues as Potent Acetylcholinesterase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2880–2882.
- (302) Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry†. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 686–694.
- (303) Basiri, A.; Murugaiyah, V.; Osman, H.; Kumar, R. S.; Kia, Y.; Awang, K. B.; Ali, M. A. An Expedient, Ionic Liquid Mediated Multi-Component Synthesis of Novel Piperidone Grafted Cholinesterase Enzymes Inhibitors and Their Molecular Modeling Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 221–229.
- (304) Dickerson, T. J.; Beuscher IV, A. E.; Rogers, C. J.; Hixon, M. S.; Yamamoto, N.; Xu, Y.; Olson, A. J.; Janda, K. D. Discovery of Acetylcholinesterase Peripheral Anionic Site Ligands through Computational Refinement of a Directed Library†. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14845–14853.
- (305) Sokolova, N. V.; Nenajdenko, V. G.; Sokolov, V. B.; Serebryakova, O. G.; Makhaeva, G. F. Synthesis and Testing of Trifluoromethyl-Containing Phosphonate–peptide Conjugates as Inhibitors of Serine Hydrolases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7216–7218.
- (306) Di Pietro, O.; Viayna, E.; Vicente-García, E.; Bartolini, M.; Ramón, R.; Juárez-Jiménez, J.; Clos, M. V.; Pérez, B.; Andrisano, V.; Luque, F. J.; Lavilla, R.; Muñoz-Torrero, D. 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[h][1,6]naphthyridines as a New Family of Potent Peripheral-to-Midgorge-Site Inhibitors of Acetylcholinesterase: Synthesis, Pharmacological Evaluation and Mechanistic Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *73*, 141–152.
- (307) Di Pietro, O.; Pérez-Areales, F. J.; Juárez-Jiménez, J.; Espargaró, A.; Clos, M. V.; Pérez, B.; Lavilla, R.; Sabaté, R.; Luque, F. J.; Muñoz-Torrero, D. Tetrahydrobenzo[h][1,6]naphthyridine-6-Chlorotacrine Hybrids as a New Family of Anti-Alzheimer Agents Targeting B-Amyloid, Tau, and Cholinesterase Pathologies. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 107–117.
- (308) Da Costa, J. S.; Lopes, J. P. B.; Russowsky, D.; Petzhold, C. L.; Borges, A. C. de A.; Ceschi, M. A.; Konrath, E.; Batassini, C.; Lunardi, P. S.; Gonçalves, C. A. S. Synthesis of Tacrine-Lophine Hybrids via One-Pot Four Component Reaction and Biological Evaluation as Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 556–563.
- (309) Barrow, J. C.; Stauffer, S. R.; Rittle, K. E.; Ngo, P. L.; Yang, Z.; Selnick, H. G.; Graham, S. L.; Munshi, S.; McGaughey, G. B.; Holloway, M. K.; Simon, A. J.; Price, E. A.; Sankaranarayanan, S.; Colussi, D.; Tugusheva, K.; Lai, M.-T.; Espeseth, A. S.; Xu, M.; Huang, Q.; Wolfe, A.; Pietrak, B.; Zuck, P.; Levorse, D. A.; Hazuda, D.; Vacca, J. P. Discovery and X-Ray Crystallographic Analysis of a Spiropiperidine Iminohydantoin Inhibitor of B-Secretase‡. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6259–6262.
- (310) Marcaccini, S.; Torroba, T. The Use of the Ugi Four-Component Condensation. *Nat Protoc.* **2007**, *2*, 632–639.
- (311) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres jr., V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.

- (312) Samadi, A.; Soriano, E.; Revuelta, J.; Valderas, C.; Chioua, M.; Garrido, I.; Bartolomé, B.; Tomassolli, I.; Ismaili, L.; González-Lafuente, L.; Villarroja, M.; García, A. G.; Oset-Gasque, M. J.; Marco-Contelles, J. Synthesis, Structure, Theoretical and Experimental in Vitro Antioxidant/pharmacological Properties of A-Aryl, N-Alkyl Nitrones, as Potential Agents for the Treatment of Cerebral Ischemia. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 951–960.
- (313) Carlier, P. R.; Chow, E. S.-H.; Han, Y.; Liu, J.; Yazal, J. E.; Pang, Y.-P. Heterodimeric Tacrine-Based Acetylcholinesterase Inhibitors: Investigating Ligand–Peripheral Site Interactions. *J Med Chem* **1999**, *42*, 4225–4231.
- (314) Del Giudice, M. R.; Borioni, A.; Mustazza, C.; Gatta, F.; Meneguz, A.; Volpe, M. T. Synthesis and Cholinesterase Inhibitory Activity of 6-, 7-Methoxy-(and Hydroxy-) Tacrine Derivatives. *Farm. Soc. Chim. Ital.* **1989** *1996*, *51*, 693–698.
- (315) Ma, Z.; Jiang, J.; Luo, S.; Cai, Y.; Cardon, J. M.; Kay, B. M.; Ess, D. H.; Castle, S. L. Selective Access to E- and Z-Alle-Containing Peptides via a Stereospecific E2 Dehydration and an O → N Acyl Transfer. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4044–4047.
- (316) Stephany, R. W.; de Bie, M. J. A.; Drenth, W. A 13C-NMR and IR Study of Isocyanides and Some of Their Complexes. *Org. Magn. Reson.* **1974**, *6*, 45–47.
- (317) Pérez-Labrada, K.; Brouard, I.; Méndez, I.; Rivera, D. G. Multicomponent Synthesis of Ugi-Type Ceramide Analogues and Neoglycolipids from Lipidic Isocyanides. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4660–4670.
- (318) Otani, Y.; Nagae, O.; Naruse, Y.; Inagaki, S.; Ohno, M.; Yamaguchi, K.; Yamamoto, G.; Uchiyama, M.; Ohwada, T. An Evaluation of Amide Group Planarity in 7-Azabicyclo[2.2.1]heptane Amides. Low Amide Bond Rotation Barrier in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15191–15199.
- (319) Kleinpeter, E. Effect of the Variation of the Ring Size of Cyclic NR<sub>2</sub> Substituents on the Barrier to Rotation in Amides, Thioamides and Related Compounds. *J. Mol. Struct.* **1996**, *380*, 139–156.
- (320) Pawar, D. M.; Khalil, A. A.; Hooks, D. R.; Collins, K.; Elliott, T.; Stafford, J.; Smith, L.; Noe, E. A. E and Z Conformations of Esters, Thiol Esters, and Amides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2108–2112.
- (321) Perrin, C. L.; Dwyer, T. J. Application of Two-Dimensional NMR to Kinetics of Chemical Exchange. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 935–967.
- (322) gNMR5.0, IvorySoft, AmorWay, Letchworth, Herts. SG61ZA, UK, 2004.
- (323) Ames, D. J.; Bhathal, P. S.; Davies, B. M.; Fraser, J. R. Hepatotoxicity of Tetrahydroaminoacridine. *Lancet* **1988**, *1*, 887.
- (324) Wilkening, S.; Stahl, F.; Bader, A. Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line Hepg2 with Regard to Their Biotransformation Properties. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2003**, *31*, 1035–1042.
- (325) Denizot, F.; Lang, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival. Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, *89*, 271–277.
- (326) Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*; Academic Press: San Diego, 2000.
- (327) Joshi, S.; Guleria, R.; Pan, J.; DiPette, D.; Singh, U. S. Retinoic Acid Receptors and Tissue-Transglutaminase Mediate Short-Term Effect of Retinoic Acid on Migration and Invasion of Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Oncogene* **2005**, *25*, 240–247.

- (328) Singh, U. S.; Pan, J.; Kao, Y.-L.; Joshi, S.; Young, K. L.; Baker, K. M. Tissue Transglutaminase Mediates Activation of RhoA and MAP Kinase Pathways during Retinoic Acid-Induced Neuronal Differentiation of SH-SY5Y Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 391–399.
- (329) Shi, C.; Zhao, L.; Zhu, B.; Li, Q.; Yew, D. T.; Yao, Z.; Xu, J. Protective Effects of Ginkgo Biloba Extract (EGb761) and Its Constituents Quercetin and Ginkgolide B against B-Amyloid Peptide-Induced Toxicity in SH-SY5Y Cells. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *181*, 115–123.
- (330) González-Muñoz, G. C.; Arce, M. P.; López, B.; Pérez, C.; Romero, A.; Barrio, L. del; Martín-de-Saavedra, M. D.; Egea, J.; León, R.; Villarroja, M.; López, M. G.; García, A. G.; Conde, S.; Rodríguez-Franco, M. I. N-Acylaminophenothiazines: Neuroprotective Agents Displaying Multifunctional Activities for a Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2224–2235.
- (331) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626.
- (332) Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54.
- (333) Darras, F. H.; Kling, B.; Heilmann, J.; Decker, M. Neuroprotective Tri- and Tetracyclic BChE Inhibitors Releasing Reversible Inhibitors upon Carbamate Transfer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 914–919.
- (334) Wang, Z.; Wang, Y.; Li, W.; Mao, F.; Sun, Y.; Huang, L.; Li, X. Design, Synthesis, and Evaluation of Multitarget-Directed Selenium-Containing Clioquinol Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**.
- (335) Bartolini, M.; Bertucci, C.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C.; Andrisano, V. Insight into the Kinetic of Amyloid Beta (1-42) Peptide Self-Aggregation: Elucidation of Inhibitors' Mechanism of Action. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2007**, *8*, 2152–2161.
- (336) Barcellos, G. B.; Pauli, I.; Caceres, R. A.; Timmers, L. F. S. M.; Dias, R.; de Azevedo, W. F. Molecular Modeling as a Tool for Drug Discovery. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 1084–1091.
- (337) Lombardo, F.; Gifford, E.; Shalaeva, M. Y. In Silico ADME Prediction: Data, Models, Facts and Myths. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 861–875.
- (338) Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10282–10286.
- (339) Nachon, F.; Carletti, E.; Ronco, C.; Trovaslet, M.; Nicolet, Y.; Jean, L.; Renard, P.-Y. Crystal Structures of Human Cholinesterases in Complex with Huprine W and Tacrine: Elements of Specificity for Anti-Alzheimer's Drugs Targeting Acetyl- and Butyryl-Cholinesterase. *Biochem. J.* **2013**, *453*, 393–399.
- (340) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
- (341) GOLDSUITE 5.2, CCDC Software, www.ccdc.cam.ac.uk. GOLDSUITE 5.2, CCDC Software, www.ccdc.cam.ac.uk. **2013**.

- (342) Darras, F. H.; Wehle, S.; Huang, G.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Amine Substitution of Quinazolinones Leads to Selective Nanomolar AChE Inhibitors with “Inverted” Binding Mode. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4867–4881.
- (343) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6.0.0, Schrödinger, LLC, New York, NY. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6.0.0, Schrödinger, LLC, New York, NY. **2013**.
- (344) Balani, S. K.; Miwa, G. T.; Gan, L.-S.; Wu, J.-T.; Lee, F. W. Strategy of Utilizing in Vitro and in Vivo ADME Tools for Lead Optimization and Drug Candidate Selection. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1033–1038.
- (345) Van de Waterbeemd, H.; Gifford, E. ADMET in Silico Modelling: Towards Prediction Paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 192–204.
- (346) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- (347) ADMET Predictor, v.6.5 Simulations Plus, Inc. Lancaster, CA. ADMET Predictor, v.6.5 Simulations Plus, Inc. Lancaster, CA. **2013**.
- (348) Wager, T. T.; Chandrasekaran, R. Y.; Hou, X.; Troutman, M. D.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A.; Will, Y. Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, in Vitro ADME, and Safety Attributes. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 420–434.
- (349) Schrödinger Suite 2013-3: QuickProp, v.3.8, Schrödinger, LLC, New York, NY. **2013**.
- (350) Atkinson, F.; Cole, S.; Green, C.; van de Waterbeemd, H. Lipophilicity and Other Parameters Affecting Brain Penetration. *Curr. Med. Chem.-Cent. Nerv. Syst. Agents* **2002**, *2*, 229–240.
- (351) Irvine, J. D.; Takahashi, L.; Lockhart, K.; Cheong, J.; Tolan, J. W.; Selick, H. E.; Grove, J. R. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 28–33.
- (352) Van Breemen, R. B.; Li, Y. Caco-2 Cell Permeability Assays to Measure Drug Absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, *1*, 175–185.
- (353) Gleeson, M. P. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 817–834.
- (354) Nielsen, P. A.; Andersson, O.; Hansen, S. H.; Simonsen, K. B.; Andersson, G. Models for Predicting Blood-Brain Barrier Permeation. *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 472–475.
- (355) Ma, X.; Chen, C.; Yang, J. Predictive Model of Blood-Brain Barrier Penetration of Organic compounds<sup>1</sup>. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 500–512.
- (356) Arendt, T.; Brückner, M. K.; Lange, M.; Bigl, V. Changes in Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer’s Disease Resemble Embryonic Development—a Study of Molecular Forms. *Neurochem. Int.* **1992**, *21*, 381–396.
- (357) Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131–138.
- (358) Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q.-S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; Chen, D.; Furukawa, K.; Sambamurti, K.; Brossi, A.; Lahiri, D. K. Selective Butyrylcholinesterase Inhibition Elevates Brain Acetylcholine, Augments Learning and Lowers Alzheimer Beta-Amyloid Peptide in Rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 17213–17218.



## Références

- (359) Gaspar, A.; Matos, M. J.; Garrido, J.; Uriarte, E.; Borges, F. Chromone: A Valid Scaffold in Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4960–4992.
- (360) Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Monjas, L.; Rademann, J.; Rodríguez-Franco, M. I. New Tacrine–4-Oxo-4H-Chromene Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer’s Disease, with Cholinergic, Antioxidant, and B-Amyloid-Reducing Properties. *J Med Chem* **2012**.
- (361) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres jr., V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- (362) Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. Fluorometric Determination of Amyloid Fibrils in Vitro Using the Fluorescent Dye, Thioflavin T1. *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 244–249.
- (363) LeVine, H. 3rd. Thioflavine T Interaction with Synthetic Alzheimer’s Disease Beta-Amyloid Peptides: Detection of Amyloid Aggregation in Solution. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1993**, *2*, 404–410.
- (364) Knox, A. J. S.; Meegan, M. J.; Lloyd, D. G. Estrogen Receptors: Molecular Interactions, Virtual Screening and Future Prospects. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 217–243.
- (365) SwissPdb Viewer 4.10, GlaxoSmithKline R&D, Switzerland. SwissPdb Viewer 4.10, GlaxoSmithKline R&D, Switzerland. **2012**.

## Résumé de thèse

### **Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement de la maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer est la pathologie neurodégénérative la plus courante affectant les personnes âgées. Cette neuropathologie se caractérise par une étiologie complexe dont le déficit en acétylcholine, les plaques amyloïdes, les dégénérescences neurofibrillaires ou le stress oxydant en sont les principaux acteurs.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'application des réactions multicomposants de Ugi et de Passerini, pour la synthèse de nouveaux adduits multi-cibles basées sur différents motifs antioxydants (acides férulique/caféique/lipoïque, mélatonine, chromone) et anticholinestérasiques (tacrine, donépézil).

Ces réactions permettent d'accéder à une vaste diversité chimique en une étape, ce qui les rend adaptées pour la synthèse rapide de molécules ayant plusieurs pharmacophores d'intérêt et ciblant ainsi différentes causes étiologiques de la maladie d'Alzheimer.

Au total, 56 composés finaux, répartis dans cinq séries, ont été synthétisés :

- les  $\alpha$ -acylaminocarboxamides prototypes (13 composés, série **A**)
- les hybrides tacrine-acide férulique (14 composés, série **B**)
- les hétérotrimères tacrine-mélatonine-acides antioxydant (8 composés, série **C**)
- les hybrides donépézil-acide férulique (12 composés, série **D**)
- les dérivés chromone (9 composés, série **E**)

Toutes les séries ont été évaluées pour leur capacité à inhiber les enzymes cholinestéras et leur pouvoir antioxydant. L'hépatotoxicité des séries **B** et **C**, portant un motif tacrine, a été évaluée sur les cellules HepG2. Par ailleurs, l'étude de la série **B** a été complétée par d'autres tests pharmacologiques, physico-chimiques et toxicologiques (étude conformationnelle en RMN, cinétique enzymatique, neuroprotection sur les cellules SH-SY5Y, inhibition de l'auto-agrégation du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, docking, ADMET).

Ces différents travaux démontrent et valident l'utilisation des réactions de Ugi et de Passerini dans le développement de molécules multi-cibles pour le traitement potentiel de la maladie d'Alzheimer.

**Mots-clés :** Maladie d'Alzheimer, réactions multicomposants, inhibiteurs des cholinestéras, antioxydants, hépatotoxicité, neuroprotection.

---

## Thesis abstract

### **Multicomponent synthesis and pharmacological assessment of new Ugi and Passerini adducts for the treatment of Alzheimer's disease**

Alzheimer's disease is the most common type of dementia affecting elderly people. This neuropathology is characterized by a highly complex and intricate etiology including cholinergic deficit, amyloid deposits, neurofibrillary tangles and oxidative stress.

During this thesis, we sought to apply Ugi and Passerini multicomponent reactions for the synthesis of new multi-target adducts based on different antioxidant (ferulic/cafeic/lipoic acids, melatonin, chromone) and anticholinergic (tacrine, donepezil) scaffolds.

These reactions provides access to a broad range of chemical diversity in a one-pot fashion, which makes them suitable for the expeditious synthesis of molecules having several pharmacophores of interest and hitting different targets related to the multifaceted etiology of Alzheimer's disease.

A total of 56 final compounds, spread over 5 series, have been synthesized:

- $\alpha$ -acylaminocarboxamides prototypes (13 compounds, **A** series)
- tacrine-ferulic acid hybrids (14 compounds, **B** series)
- tacrine-melatonin-antioxydant acids heterotrimers (8 compounds, **C** series)
- donepezil-ferulic acid hybrids (12 composés, **D** series)
- chromone derivatives (9 compounds, **E** series)

All the series were tested for their ability to inhibit the cholinesterases enzymes and for their antioxidant power. Hepatotoxicity of the **B** and **C** series, bearing a tacrine fragment, was evaluated on HepG2 cells. Moreover, the study of the **B** series was supplemented by further pharmacological, physicochemical and toxicological tests (NMR conformational study, neuroprotection on SH-SY5Y cells, self-induced A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide aggregation inhibition, docking, ADMET).

Such work demonstrated and validated the use of Ugi and Passerini reactions for the development of new multi-target directed molecules for the potential treatment of Alzheimer's disease.

**Keywords :** Alzheimer's disease, multicomponent reactions, cholinesterases inhibitors, antioxidants, hepatotoxicity, neuroprotection.